
BACHELORARBEIT

Frau
Sandra Tzschentke

**Herstellung und Charakterisierung
von Einzelkettenantikörpern
fusioniert mit monomerem
Streptavidin**

2016

BACHELORARBEIT

Herstellung und Charakterisierung von Einzelkettenantikörpern fusioniert mit monomerem Streptavidin

Autorin:

Sandra Tzschentke

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI13w1-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Hanns Achim Temme

Zweitprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde

Mittweida, August 2016

Bibliografische Angaben

Tzschentke, Sandra: Herstellung und Charakterisierung von Einzelkettenantikörpern fusioniert mit monomerem Streptavidin, 69 Seiten, 25 Abbildungen, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften

Bachelorarbeit, 2016

Referat

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Danksagung	V
1 Einleitung	1
1.1 Einzelkettenantikörper	2
1.2 Prostate stem cell antigen	3
1.3 Epidermal growth factor receptor	3
1.4 Monomeres Streptavidin	4
1.5 Proteinproduktion	5
1.6 Proteinaufreinigung	6
2 Zielstellung	7
3 Material und Methoden	9
3.1 Material	9
3.1.1 Antibiotika	9
3.1.2 Antikörper	9
3.1.3 Chemikalien und Puffer	10
3.1.4 Enzyme	13
3.1.5 Geräte	13
3.1.6 Größenstandards	14
3.1.7 Inhibitoren	14
3.1.8 Medien	14
3.1.9 Plasmid	15
3.1.10 Zelllinien	15
3.2 Molekularbiologische Methoden	16
3.2.1 Restriktionsendonukleasespaltung	16

3.2.2	Agarosegelelektrophorese	17
3.2.3	Sequenzierung	17
3.3	Proteinbiochemische Methoden	17
3.3.1	Proteinsynthese	17
3.3.2	Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie	18
3.3.3	Dialyse	18
3.3.4	Proteinbestimmung	19
3.3.5	Milde Lyse	19
3.3.6	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	20
3.3.7	Coomassie-Gel	20
3.3.8	Western Blot	20
3.3.9	PonceauS-Färbung	21
3.3.10	Protein-Detektion	21
3.3.11	„Stripping“ der PVDF-Membran	22
3.4	Zellbiologische Methoden	22
3.4.1	Kultivierung der Zelllinien	22
3.4.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	22
3.4.3	Transiente Transfektion mit Polyethylenimin zur Generierung lentiviraler Partikel	23
3.4.4	Stabile Transduktion	23
3.4.5	Durchflusszytometrie	24
4	Ergebnisse	27
4.1	Generierung stabiler Zelllinien zur Produktion von hu-scFv(AM1)-mSA und scFv(MR1.1)-mSA	27
4.1.1	Herstellung lentiviraler Partikel	27
4.1.2	Stabile Transduktion	28
4.1.3	Selektion	28
4.2	Etablierung der Proteinproduktion	28
4.2.1	Proteinaufreinigung mit Nickel-NTA-Säulen	28
4.2.1.1	Western Blots des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA	28
4.2.1.2	Western Blot des Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA	32
4.2.2	Coomassie Gele und PonceauS-Färbung	33

4.2.3	Untersuchung der Antikörperproduktion und -aufreinigung bei Verwendung von großen Mengen an BioLock oder Avidin	36
4.2.4	Untersuchung der Antikörperproduktion und -aufreinigung ohne Verwendung von BioLock oder Avidin	37
4.3	Untersuchung der Bindung an die Zieltumorzellen	38
4.4	Untersuchung der Bindung an die Effektorzellen	43
4.4.1	Durchflusszytometrische Analyse	44
4.4.2	Western Blot Analyse	49
5	Diskussion	53
5.1	Generierung stabiler Zelllinien zur Produktion von hu-scFv(AM1)-mSA und scFv(MR1.1)-mSA	53
5.2	Etablierung der Proteinproduktion	53
5.2.1	Proteinaufreinigung mit Nickel-NTA-Säulen	53
5.2.1.1	Western Blots des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA	54
5.2.1.2	Western Blots des Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA	55
5.2.2	Coomassie Gele und PonceauS-Färbung	55
5.2.3	Untersuchung der Antikörper bei Verwendung von großen Mengen an BioLock oder Avidin (50 µg/ml)	56
5.2.4	Untersuchung der Antikörper ohne Verwendung von BioLock oder Avidin	56
5.3	Untersuchung der Bindung an die Zieltumorzellen	57
5.4	Untersuchung der Bindung an die YTS-Effektorzellen	58
5.4.1	Durchflusszytometrische Analyse	58
5.4.2	Western Blot Analyse	59
6	Ausblick	61
7	Zusammenfassung	63

II. Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung der Funktionsweise von den herzustellenden Einzelkettenantikörpern.....	1
1.2	Aufbau eines Einzelkettenantikörpers	2
4.1	Schematischer Aufbau der Einzelkettenantikörper	27
4.2	Western Blot des mit Avidin versetzten Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA. .	29
4.3	Western Blot des mit BioLock versetzten Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA.	30
4.4	Western Blot des mit Avidin bzw BioLock versetzten Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA.	32
4.5	Mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel des mit Avidin oder BioLock versetzten Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA.....	33
4.6	Mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel des mit Avidin oder BioLock versetzten Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA.	34
4.7	Mit PonceauS gefärbte PVDF-Membran des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA	35
4.8	Mit PonceauS gefärbte PVDF-Membran des Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA	35
4.9	Western Blot des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA bei der Verwendung hoher Avidin- bzw. BioLock-Konzentrationen (50 µg/ml).....	36
4.10	Western Blot des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA ohne Verwendung von Avidin bzw. BioLock.....	37
4.11	Bindungsstudie der mit Avidin produzierten Einzelkettenantikörper an die Tumorzellen	39
4.12	Bindungsstudie der mit BioLock produzierten Einzelkettenantikörper an die Tumorzellen	40
4.13	Bindungsstudie der Einzelkettenantikörper mit hoher Avidin-Konzentration an die Tumorzellen.....	41
4.14	Bindungsstudie der Einzelkettenantikörper mit hoher BioLock-Konzentration an die Tumorzellen	42
4.15	Bindungsstudie des scFv(MR1.1)-KiBAP als Positivkontrolle an die Tumorzellen	43

4.16 Kontrolle der Biotinylierung der YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen	44
4.17 Bindungsstudie des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA mit Avidin oder Bio-Lock an die Effektorzellen	45
4.18 Bindungsstudie des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA mit hoher Avidin- bzw. BioLock-Konzentration (50 μ g/ml) an die Effektorzellen	46
4.19 Kontrolle der Biotinylierung der YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen	47
4.20 Biotinylierung der YTS-Zellen nach der Einzelkettenantikörperbindung	48
4.21 Western Blot der mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA inkubierten YTS-NK-Zellen bei dem der VSV-G-Tag des Einzelkettenantikörpers detektiert wurde	49
4.22 Western Blot der mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA inkubierten YTS-NK-Zellen bei dem der His6-Tag des Einzelkettenantikörpers detektiert wurde ...	50
4.23 Western Blot der mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA inkubierten YTS-NK-Zellen bei dem der myc-Tag des Signaladapters Δ DAP12-KiBAP (20 kDa) detektiert wurde	51

III. Tabellenverzeichnis

3.1	Antibiotika	9
3.2	Übersicht über die verwendete FACS-Antikörper	9
3.3	Übersicht über die bei Western Blot verwendeten Antikörper	10
3.4	Lösungen für die Kultivierung von Zelllinien	10
3.5	Chemikalien für die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden	11
3.6	Lösungen für die Zellkultur	11
3.7	Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten	11
3.8	Puffer für proteinbiochemische Arbeiten	12
3.9	Puffer für molekularbiologische Arbeiten	13
3.10	Übersicht über die verwendeten Enzyme	13
3.11	Verwendete Geräte	13
3.12	Übersicht über die verwendeten Größenstandards	14
3.13	Inhibitoren	14
3.14	Medium zum Kultivieren von Zelllinien	14
3.15	Plasmide	15
3.16	Verwendete Zelllinien	15
3.17	Restriktionsansatz	17
3.18	Sequenzierungsansatz	17
3.19	Zugabe von BioLock und Avidin pro 10 ml Medium	18
4.1	Proteinkonzentrationen in µg/ml der Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritte (E1, E2) bei Zugabe verschiedener Volumina des mit Avidin hergestellten Einzelkettenantikör- pers zur Nickel-NTA-Säule	31
4.2	Proteinkonzentrationen in µg/ml der Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritte (E1, E2) bei Zugabe verschiedener Volumina des mit BioLock hergestellten Einzelkettenanti- körpers zur Nickel-NTA-Säule	31
4.3	Mittlere Fluoreszenzintensität	48

IV. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGFRvIII	epidermal growth factor receptor variant III
FKS	Fötales Kälberserum
mSA	monomeres Streptavidin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PEI	Polyethylenimin-Lösung
PSCA	Prostate Stem Cell Antigen
scFv	single chain variable fragment

V. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle gern bei all denen bedanken, ohne die ich diese Arbeit nie bewerkstelligt hätte.

Besonders Herrn Prof. Dr. Hanns Achim Temme möchte ich danken, dass ich dieses interessante Thema in meiner Arbeit bearbeiten durfte. Vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung, die vielen Tipps und Ideen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dirk Labudde für die Betreuung sowie das Interesse und die Begutachtung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich Dr. Susanne Michen herzlich danken für ihre ausgezeichnete Betreuung. Sie hat mich jeden Tag mit Rat und Tat unterstützt.

Des weiteren möchte ich allen Mitarbeitern von Herrn Prof. Dr. Hanns Achim Temme für die vielen Tipps und Diskussionen danken: Isabell Schau, Bianca Goldberg und Katja Robel.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, an meinen Bruder sowie an meine Freunde und an all die, die mich in den letzten Jahren während meines Studiums unterstützt haben.

1 Einleitung

Da Krebs bei vielen Patienten z. B. durch eine Chemotherapie oder Operation nicht vollständig entfernt wird bzw. der Krebs bereits in anderen Geweben oder Organen wächst, wird nach anderen Therapiemöglichkeiten geforscht. Eine dieser Therapiemöglichkeiten ist der Einsatz von Einzelkettenantikörpern, welche an bestimmte Antigene von Tumorzellen binden können. In dieser Arbeit sollten Tumorantigen-spezifische Einzelkettenantikörper produziert werden, die an ein monomeres Streptavidin gekoppelt sind, über das sie an biotinylierte Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) binden können. Dadurch sollen die NK-Zellen bei der Erkennung und Abtötung der Tumorzellen unterstützt werden (siehe Abbildung 1.1).

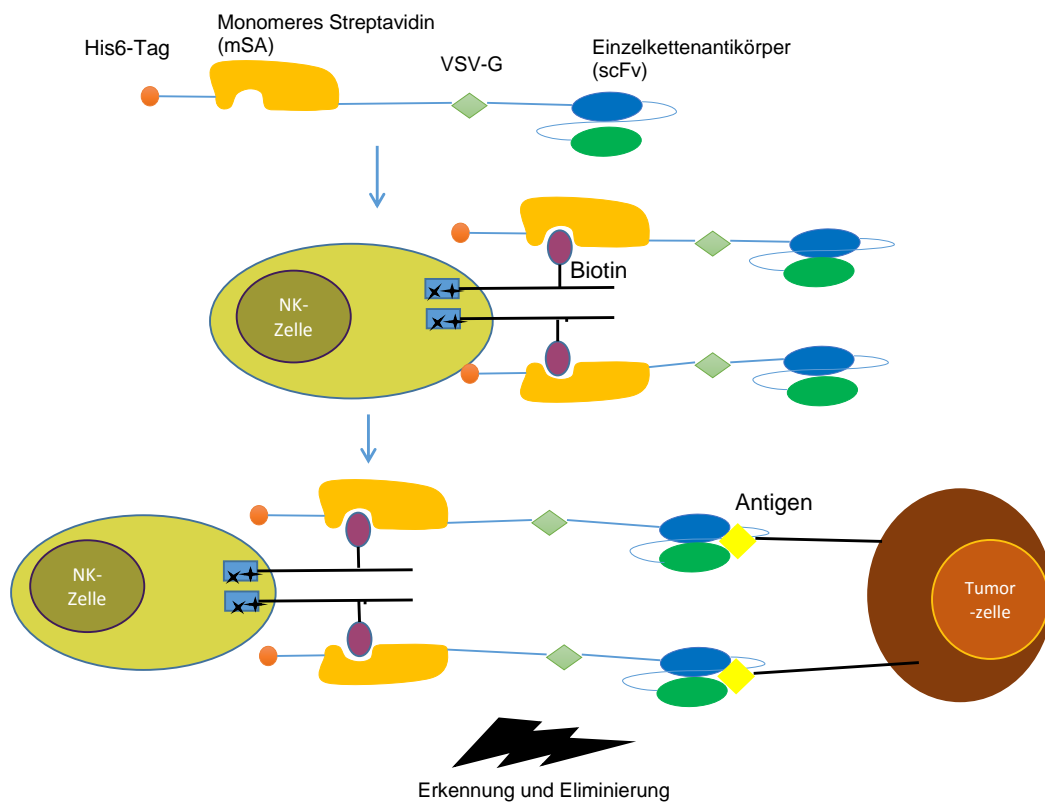


Abbildung 1.1: Darstellung der Funktionsweise von den herzustellenden Einzelkettenantikörpern

1.1 Einzelkettenantikörper

Nach Malpiedi et al., 2013 ist ein Einzelkettenantikörper eine Immunoglobulineinheit, welche aus 4 Peptidketten (2 schweren und 2 leichten Ketten) besteht. Jede dieser Ketten hat wiederum einen variablen und einen konstanten Teil. Diese Ketten sind mit Hilfe von Disulfidbrücken verbunden. Die Bindestelle für das Antigen besteht aus den variablen Regionen sowie den ersten Einheiten der konstanten Regionen von sowohl der leichten als auch der schweren Kette (Malpiedi et al., 2013).

Werden die variablen Bereiche der leichten und schweren Ketten mit einem Linker verbunden, entsteht ein Einzelkettenantikörper. Dieser Linker, welcher meist aus einer Glycin- und Serin-Folge besteht, sollte eine Länge von 20- 25 Aminosäuren haben (Malpiedi et al., 2013). Der Einzelkettenantikörper, welcher zu den kleinsten Immunoglobulineinheiten zählt, besitzt eine Größe von circa 25 kDa (Bird et al., 1988). Dadurch eignet es sich für einen schnellen Transport im Blut besser als der circa 150 kDa große Antikörper (Janeway et al., 2001), (Yokota et al., 1992).

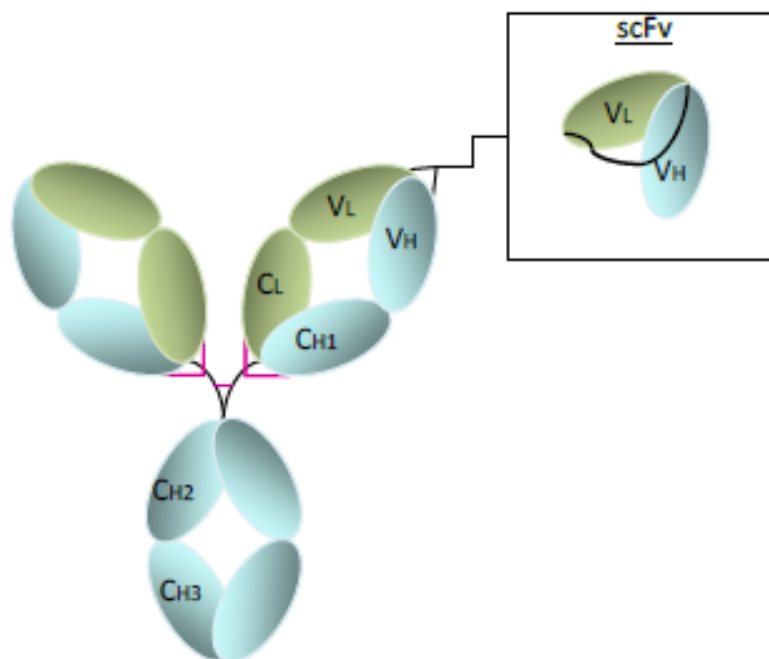


Abbildung 1.2: **Aufbau eines Einzelkettenantikörpers.** Der Antikörper besteht aus zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten und diese wiederum setzen sich aus konstanten (C) und variablen (V) Bereichen zusammen. Ein Einzelkettenantikörper (scFv) dagegen besteht nur aus den variablen Bereichen, einer schweren und einer leichten Kette eines Antikörpers, die über einen Linker verbunden sind (Abbildung von Tietze, 2015.)

Die in dieser Arbeit verwendeten Einzelkettenantikörper sind der humanisierten AM1,

welcher gegen das Prostatastammzellantigen (PSCA) gerichtet ist und der MR1.1, welcher an die Variante III des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFRvIII) bindet.

1.2 Prostate stem cell antigen

Die Antigene von Tumoren lassen sich in tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene einteilen. Bei tumorassoziierten Antigenen wird das Antigen auch von gesunden Zellen exprimiert. Die tumorspezifischen Antigene hingegen werden nicht von gesunden Zellen gebildet (Martinez, 2001). Das Prostatastammzellantigen (PSCA) ist ein tumorassoziiertes Antigen und ist auf der Oberfläche von Prostatakrebszellen lokalisiert. Jedoch wird es auch auf gesunden Prostatazellen exprimiert (Feldmann et al., 2011). Das PSCA hat eine Sequenz, welche 123 Aminosäuren lang ist, und enthält sowohl eine Signalsequenz am N-Terminus als auch mehrere N-Glykosylierungsstellen. Zu dem liegt das Molekulargewicht dieses Antigens zwischen 10 - 24 kDa (Reiter et al., 1998). Es besitzt eine Ähnlichkeit von 30 % zu dem Stammzellantigen Typ 2 (SCA-2), was ein Oberflächenmarker von unreifen Lymphozyten ist (Gu et al., 2000). Daher kommt auch der Name dieses Antigens. Es gehört zur der Ly-6/Thy-1-Familie, deren Mitglieder mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert sind (Watabe et al., 2002).

Das Prostatastammzellantigen wurde bei den Basalzellen der Epithelschicht von Prostatakrebs und bei den Zellen der Plazenta, Niere, Blase und des Magen-Darm-Traktes gefunden (Gu et al., 2000). Bei mehr als 80 % der primären Prostatakrebszellen und Knochenkrebszellen kann eine Überexpression gezeigt werden. Je weiter die Tumorerkrankung fortschreitet und je höher der Grad der Tumorerkrankung ist, desto stärker wird das PSCA exprimiert. In normalen Zellen wird dieses Antigen jedoch nur gering exprimiert (Feldmann et al., 2011), (Gu et al., 2000). Dadurch kann es als Zielstruktur für die Tumorthherapie verwendet werden, obwohl es ein tumorassoziiertes Antigen ist (Feldmann et al., 2011). Der Einzelkettenantikörper AM1, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, ist gegen das PSCA gerichtet.

1.3 Epidermal growth factor receptor

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ist ein Zellmembranprotein und ein tumorspezifisches Antigen (Gan et al., 2013). Normalerweise binden entweder der epidermale Wachstumsfaktor oder der transformierte Wachstumsfaktor- α an den EGFR. Dadurch kommt es zur Dimerisierung, was wiederum die Autophosphorylierung der Tyrosinreste des EGFRvIII und somit die Proliferation zur Folge hat (Kuan et al., 2001). Bei der am häufigsten vorkommenden Mutation des EGFR, welche EGFRvIII genannt

wird, besitzt dieser Rezeptor eine Deletion der Aminosäuren 6 bis 273 innerhalb der extrazellulären Region. Aufgrund dieser Deletion wird ein Glycinrest bei der Aminosäuren 5 eingefügt, infolge dessen kann sowohl der epidermalen Wachstumsfaktor als auch der transformierte Wachstumsfaktor- α nicht an den Rezeptor binden, jedoch kann er dadurch dimerisieren (Davies et al., 2006), (Wikstrand et al., 1995). Durch die konstitutiv aktive Tyrosinkinase, welche in der intrazellulären Region des Rezeptors lokalisiert ist, wird die Autophosphorylierung von Tyrosinresten des EGFRvIII stimuliert. Dadurch wird die Entstehung von Tumoren und die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika begünstigt (Nagane et al., 1996), (Huang et al., 1997), (Narita et al., 2002), (Sampson et al., 2008).

Der EGFRvIII gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren und ist 154 kDa groß (Heimberger et al., 2005), (Wikstrand et al., 1998). Dieser Rezeptor wird unter anderem in Gliomen, Lungen- und Brustkrebs exprimiert (Shankar et al., 2006). Der EGFRvIII erscheint meist im Glioblastom, welches die am häufigsten vorkommende und am meisten maligne Form von Hirntumoren ist (Sampson et al., 2008).

Anders als bei PSCA wird das EGFRvIII nicht bei gesunden Zellen exprimiert, sondern nur bei Tumorzellen, weshalb es für die Tumorthherapie geeignet ist (Fenstermaker and Ciesielski, 2004).

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Einzelkettenantikörper MR1.1 ist gegen den EGFRvIII gerichtet und wurde aus einer variablen Region eines Antikörpers, welcher bei einem Phagendisplay von den Zellen einer Mausmilz isoliert wurde, gewonnen (Wikstrand et al., 1998). Anschließend wurde der MR1.1, welcher eine Mutation des MR1 ist und mit sehr hoher Affinität an den EGFRvIII bindet, entdeckt (Kuan et al., 2000). Er besitzt eine 15-fach stärkere Affinität als der MR1 (Shankar et al., 2006).

1.4 Monomeres Streptavidin

Das monomere Streptavidin besteht aus den Komponenten Rhizavidin und Streptavidin. Es ist 13 kDa groß und trotz seiner zwei Komponenten stabil (Demonte et al., 2013).

Die beiden Peptide Rhizavidin und Streptavidin haben nur eine 30 %ige Ähnlichkeit ihrer Kernsequenz in der β -Fass-Struktur, jedoch weisen beide eine hohe Strukturähnlichkeit auf. Rhizavidin ist anders als Streptavidin kein Tetramer sondern ein Dimer (Demonte et al., 2013). Rhizavidin wird aus *Rhizobium etli* gewonnen (Lim et al., 2013), Streptavidin hingegen aus *Streptomyces avidinii*. Das Rhizavidin besitzt eine hohe Affinität gegenüber Biotin als Streptavidin (Müller et al., 2013).

Die Biotinbindestellen des Streptavidins befinden sich in den β -Fass-Einheiten. Da das Streptavidin ein Tetramer ist, hat es vier Untereinheiten (β -Fass-Strukturen). Die Ami-

nosäuren, welche das Biotin binden, sind stark konservierte Bereiche (Laitinen et al., 2006). Des Weiteren besitzt das Streptavidin einen hydrophobes W120, welches das gebundene Biotin vor anderen Solventen beschützt, in dem es als eine Art „Deckel“ fungiert (Demonte et al., 2013). Aufgrund der 4 Bindestellen des tetrameren Streptavidins kann es zu unerwünschten Bindungen und daraus folgend zu negativen Nebeneffekten kommen, wie Kreuzvernetzungen der Rezeptoren, was wiederum die Aktivierung des Immunsystems zur Folge haben kann (Demonte et al., 2014). Für die Herstellung des monomeren Streptavidins wurden Aminosäurereste des Streptavidins durch die korrespondierenden Aminosäuren des Rhizavidins, welche für die Stabilität und die Affinität verantwortlich sind, ausgetauscht. Die meisten ausgetauschten Aminosäuren haben konservierte van-der-Waal-Bereiche und Hydrogen-Bindestellen. Es wurden jedoch auch Reste ausgetauscht, welche nicht korrespondieren. Dadurch entstehen zusätzlich Disulfidbrücken bei der Biotin-Bindestelle, was die Unterstützung der Biotinbindung zur Folge hat (Lim et al., 2013).

Bei dem Vergleich der Denaturierungstemperaturen des tetrameren Streptavidins und des monomeren Streptavidins (mSA) ist zu sehen, dass der Komplex aus monomerem Streptavidin und Biotin eine höhere Temperatur besitzt als der tetramere Streptavidin-Biotin-Komplex und damit auch stabiler ist. Jedoch besitzt das monomere Streptavidin nicht so eine hohe Affinität wie das tetramere Streptavidin. Diese Eigenschaft kann aber auch verwendet werden, um das Biotin wieder von den Liganden abzulösen. Das ist bei der Aufreinigung von biotinylierbaren Stoffen mit Biotin wichtig (Lim et al., 2013).

1.5 Proteinproduktion

Zur Herstellung von Proteinen werden verschiedene Organismen verwendet, wie unter anderem *Escherichia coli*. Dieser Organismus wird häufig eingesetzt, da er unter anderem schnell wächst, eine hohe Genexpressionsrate besitzt, das Verfahren durch Abgabe der Proteine ins Medium erleichtert und nur wenig Kosten verursacht. Auch Hefen sind aufgrund der ähnlichen Eigenschaften für die Proteinproduktion geeignet (Antranikian, 2006), (Verma et al., 1998). Der Nachteil bei der Verwendung von Bakterien wie *Escherichia coli* ist, dass keine posttranslationalen Modifikationen ausgeführt werden. Des Weiteren wurden Probleme bei der Faltung von eukaryotischen Proteinen beobachtet. Dies wird besonders bei Vorhandensein von Cystein-Resten oder Disulfidbrücken deutlich (Antranikian, 2006), (Verma et al., 1998). Dies kann durch die Verwendung von unter anderem Säugerzellen behoben werden, da in diesen Zellen eukaryotische Proteine richtig gefaltet werden und die posttranslationale Modifikation vollständig durchgeführt wird. Weitere Vorteile bei der Verwendung von Säugetierzellen sind eine bessere Qualität der Proteine und eine effektivere Produktion dieser als in Hefe, Bakterien oder sogar Pflanzenzellen (Wurm, 2004), da die Säugetierzellen die Signale für die Herstellung der Proteine besser erkennen (Verma et al., 1998).

In dieser Arbeit werden die Einzelkettenantikörper in HEK293T-Zellen (humane embryonale Nierenkarzinomzelllinie) produziert.

1.6 Proteinaufreinigung

Nach der Herstellung von Proteinen, wie den Einzelkettenantikörpern in dieser Arbeit, müssen diese aufgereinigt werden. Dies kann mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden. Die am häufigsten verwendete Methode dafür ist die Affinitätschromatografie. Des Weiteren gibt es auch nicht Affinitäts-basierende-Chromatographie-Verfahren und Nicht-Chromatographie-Verfahren (Malpiedi et al., 2013).

Laut Malpiedi et al. (2013) werden bei der Affinitäts-basierten-Chromatographie verschiedene Liganden wie natürliche, Tag- oder biometrische Liganden verwendet. Dabei wird der gewünschte Antikörper von Liganden gebunden, welche an den Chromatographen befestigt sind. Die natürlichen Liganden werden auf der Oberfläche von unterschiedlichen Bakterien-Stämmen produziert. Dazu gehören IgG-bindende Proteine, welche sehr gut mit Immunoglobinen von Säugetieren interagieren. Die Tag-Liganden können sowohl synthetische als auch natürlich Proteine sehr gut binden. Zu diesen Liganden gehören kurze Sequenzen oder auch große Proteine, welche als Fusionspartner der Zielproteine fungieren. Die am häufigsten genutzte Methode bei den Tag-Liganden ist die Verwendung von immobilisierten Metall-Affinitätschromatografie-Säulen, bei denen die Metallionen als Liganden eingesetzt werden. Einige Proteine, wie auch die Einzelkettenantikörper in dieser Arbeit, enthalten einen Sequenzabschnitt mit 5-6 Histidinen, welche auch an Metalle wie das in dieser Arbeit verwendete Nickel binden (Malpiedi et al., 2013). Die biometrischen Liganden wurden synthetisch hergestellt und sind deshalb günstiger als die anderen Liganden, obwohl sie dennoch robust sind. Die am häufigsten erforschte Methode ist die Nicht-Affinitäts-basierte Chromatographie. Dazu gehören Methoden wie Ionenaustausch, Selektion nach der Proteingröße oder hydrophobe Bindungen (Malpiedi et al., 2013).

Zu den Nicht-Chromatographie-Methoden gehören unter anderem die Ausfällung oder die Extraktion. Die Bildung von Feststoffen, welche das Zielprotein enthalten, ist das Ergebnis. Dieser Feststoff kann dann anschließend filtriert und so von den flüssigen Stoffen getrennt werden (Malpiedi et al., 2013).

2 Zielstellung

Da der Krebs nach der Behandlung z. B. mit Chemotherapie häufig wiederkehrt, weil die Tumorzellen nicht vollständig entfernt wurden oder Metastasen in anderen Geweben oder Organen wachsen, wird nach weiteren Tumortherapiemöglichkeiten geforscht. Eine dieser Forschungsgebiete für die Tumorthherapie ist die Verwendung von Einzelkettenantikörpern zur Unterstützung der NK-Zellen bei der Erkennung und Abtötung von Tumorzellen.

Zu den Zielen in dieser Arbeit gehörte die Herstellung der Einzelkettenantikörperproduzierenden HEK293T-Zelllinien mittels lentiviraler Partikel, die mit Hilfe der lentiviralen Expressionsvektoren (pHATrick-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro und pHATrick-scFv(MR1.1)-mSA-Puro) generiert werden sollten. Nachfolgend bestand die Aufgabe darin, die Einzelkettenantikörper zu produzieren und mit Hilfe der Nickel-NTA-Säule über ihren His6-Tag aufzureinigen. Des Weiteren sollten die Einzelkettenantikörper mittels Western Blot und Durchflusszytometrie genauer untersucht und ihre Bindung an die Tumorzellen bzw. YTS-NK-Zellen überprüft werden. Dabei sollten die Einzelkettenantikörper mit ihrem monomeren Streptavidin zunächst an biotinyliert YTS-NK-Zellen und anschließend an die entsprechenden Antigene auf den Tumorzellen binden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antibiotika

Tabelle 3.1: Antibiotika

Name	Hersteller	Stammlösung	Arbeitslösung	Verwendung
Penicillin	Gibco	10.000 IU/ml	100 IU/ml	sterile Zellkultur
Puromycin	Clontech	50 mg/ml	10 µg/ml bei HEK293T	Selektion von eukaryotischen Zellen
Streptomycin	Gibco	10 mg/ml	100 µg/ml	sterile Zellkultur

3.1.2 Antikörper

Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendete FACS-Antikörper

Name	Quelle	Verdünnung	Hersteller (Klon, Katalognummer)
anti-Biotin-APC	Maus IgG1, monoklonal	1:11	Miltenyi (Klon Bio3-18E7, #130-090-856)
anti-Biotin-PE	Maus, IgG1, monoklonal	1:11	Miltenyi (Klon Bio3-18E7, #130-090-756)
anti-His-PE	Maus, IgG1, monoklonal	1:11	Miltenyi (Klon GG11-8F3.5.1. #130-092-691)
anti-c-myc-FITC	Maus, IgG1, monoklonal	1:11	Miltenyi(Klon SH1-26E7.1.3, #130-092-472)
Isotypkontrolle APC, FITC, PE	Maus, IgG1, monoklonal	1:11	Miltenyi (Klon IS5-21F5, #130-092-214/3/2)

Tabelle 3.3: Übersicht über die bei Western Blot verwendeten Antikörper

Name	Quelle	Verdünnung	Hersteller (Klon, Katalognummer)
anti-Maus-HRP	Kaninchen, polyklonal	1:1000	DAKO (#P0260)
anti- α -Tubulin	Maus, IgG1, monoklonal	1:8000	Santa Cruz (Klon DM1A, #sc-32293)
anti-VSV-G	Maus, IgG1, monoklonal	1:5000-1:8000	Santa Cruz (Klon P5D4, #sc-66180)
anti-6x-His-tag	Maus, IgG2b, monoklonal	1:1000	abcam (Klon HIS.H8, #ab18184)
anti-c-myc	Maus, IgG2a monoklonal	1:5000	Invitrogen (Klon 9E11, #AHO0052)

3.1.3 Chemikalien und Puffer

Tabelle 3.4: Lösungen für die Kultivierung von Zelllinien

Name	Zusammensetzung	Verwendung
Blockierungslösung	0,5 % BSA in PBS (w/v) (Lagerung bei 4 °C)	Zellfärbung mit Antikörpern
Natriumbutyrat	SL 500 mM in PBS, AL 10 mM, 0,2 μ m steril filtriert (Lagerung bei 4 °C)	Virusproduktion
1x PBS (Phosphate Buffered Saline)	bezogen von Gibco, ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} (Lagerung bei 4 °C)	Waschen von Zellen
Polybren	10 mg/ml 0,2 μ M steril filtriert (Lagerung bei 4 °C)	Virusproduktion
Polyethylenimin-Lösung (PEI)	SL 100 mg/ml, AL 1 mg/ml, 0,45 μ m steril filtriert (Lagerung bei 4 °C)	Transfektion
Trypanblau	0,4 % in 0,9 % NaCl-Lösung	Farbstoff um lebende Zellen zu zählen
Trypsin / EDTA (0,05 %)	bezogen von Gibco (Lagerung bei 4 °C)	zum Ablösen adhärenter Zellen

Tabelle 3.5: Chemikalien für die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden

Name	Verwendung
Agarose	Herstellung von DNA-Gelen
Acrylamid-Bis-Lösung (29:1)	Herstellung von Protein-Gelen
6-Aminocaprinsäure	Herstellung von Kathodenpuffer
Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumin“, BSA)	Abdeckung unspezifischer Proteinbindungen (Lagerung 4 °C)
Imidazol	Proteinaufreinigung
β -Mercaptoethanol	Ablösen von Antikörpern von der PVDF-Membran
Methanol	Aktivierung der PVDF-Membran
Milchpulver	Abdeckung unspezifischer Proteinbindungen
PBS-Lösung	Dialyse
Ponceau S	Anfärbung von Proteinen auf der PVDF-Membran
Triton X-100	Waschen der PVDF-Membranen
Tween 20	Waschen der PVDF-Membranen

Tabelle 3.6: Lösungen für die Zellkultur

Name	Verwendung
Avidin	Biotinentfernung
BioLock Solution	Biotinentfernung
Fötales Kälberserum (FKS)	Zellkulturmedium
L-Glutamin	Zellkulturmedium
Hepes	Zellkulturmedium

Tabelle 3.7: Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten

Name	Zusammensetzung	Verwendung
Imidazol-Elutionslösung	350 mM Imidazol 150 mM NaCl in PBS gelöst	Proteinaufreinigung
Imidazol-Waschlösung I	10 mM Imidazol 150 mM NaCl in PBS gelöst	Proteinaufreinigung
Imidazol-Waschlösung II	20 mM Imidazol 150 mM NaCl in PBS gelöst	Proteinaufreinigung

Tabelle 3.8: Puffer für proteinbiochemische Arbeiten

Name	Zusammensetzung	Verwendung
Anodenpuffer I	300 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)	Western Blot
Anodenpuffer II	25 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)	Western Blot
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 40 mM 6-Aminocapronsäure 20 % Methanol (v/v)	Western Blot
4x Laemmli-Puffer	60 mM Tris-Cl (pH 6,8) 2 % SDS 10 % Glycerin 5 % β -Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau (Lagerung bei -20 °C)	Denaturierung von Proteinen und Auftrag dieser Proteine auf SDS-Gele
Luminata Forte Western HRP Substrate	von Milipore	Detektion von Proteinen auf der PVDF-Membran
RIPA-Lysepuffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 140 mM NaCl 0,025 % NaN ₃ (v/v) 1 % Triton X-100 (Lagerung bei 4 °C)	Zelllyse
Sammelgel-Puffer (pH 6,8)	1,5 M Tris-Cl (Lagerung bei 4 °C)	SDS-Page
10x SDS-Laufpuffer	10x SDS-Ladepuffer 14,4 % Glycin 1 % SDS 6 % Tris-Base	SDS-Page
Stripping-Puffer (pH 7,0)	62,5 mM Tris-HCl 2 % SDS 0,7 % β -Mercaptoethanol	Ablösung von Antikörpern von der PVDF-Membran
10x TBS (pH 7,5)	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl	Waschen der PVDF-Membran
1x TBS-TT	1x TBS 0,2 % Triton X-100 (v/v)	Waschen der PVDF-Membran
Trenngel-Puffer (pH 8,8)	1,5 mM Tris-HCl (Lagerung bei 4 °C)	SDS-Page

Tabelle 3.9: Puffer für molekularbiologische Arbeiten

Name	Zusammensetzung	Verwendung
50x TAE Puffer	2 M Tris 5,7 % (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA (pH 8,0)	Agarosegelelektrophorese
6x DNA Gel Loading Dye	Thermo Fischer Scientific	Agarosegelelektrophorese

3.1.4 Enzyme

Tabelle 3.10: Übersicht über die verwendeten Enzyme

Name	Verwendung	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	Kontrollverdau	Fermentas

3.1.5 Geräte

Tabelle 3.11: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Alphamanager	Biozym Scientific GmbH
Cleanbench LaminAir HB2472	Heraeus Holding GmbH
Heraeus Function Line T60	Thermo Fischer Scientific Inc.
Luminometers LAS-3000	FujiFilm Europa GmbH
MACS Quant	Miltenyi Biotech GmbH
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories AG
PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories AG
Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader	BioTek Instruments Inc.
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories AG
VWR Power Source	VWR International GmbH

3.1.6 Größenstandards

Tabelle 3.12: Übersicht über die verwendeten Größenstandards

Name	Verwendung	Hersteller
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Nukleinsäuregrößenstandard	Thermo Fischer Scientific Inc.
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10- 250 kDa	Proteingrößenstandard	Thermo Fischer Scientific Inc.

3.1.7 Inhibitoren

Tabelle 3.13: Inhibitoren

Name	Verwendung	Lagerung	Hersteller
Apoprotin	Proteaseinhibitor, 5 µg/ml	-20 °C	Roche
Leupeptin	Proteaseinhibitor, 10 µg/ml	-20 °C	Roche

3.1.8 Medien

Tabelle 3.14: Medium zum Kultivieren von Zelllinien

Name	Zusammensetzung
DMEM (ohne)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) mit 4,5 g/l Glukose, Natriumpyruvat und L-Glutamin,
DMEM (komplett)	DMEM (ohne) und zusätzlich: 10 % hitzeinaktiviertes, fetales Kälberserum (FKS), 10 mM HEPES, 100 IU/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin,

Name	Zusammensetzung
DMEM (15 %)	DMEM (ohne) und zusätzlich: 15 % hitzeinaktiviertes, fetales Kälberserum (FKS) 10 mM HEPES 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
RPMI-1640 (komplett)	Roswell Park Memorial Institute Medium (Gibco) 10 % hitzeinaktiviertes, fetales Kälberserum (FKS), 10 mM HEPES 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin

3.1.9 Plasmid

Tabelle 3.15: Plasmide

Name	Beschreibung
pHATrick-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro	lentiviraler Expressionsvektor für den humanisierter scFv-(AM1)-mSA Einzelkettenantikörper
pHATrick-scFv(MR1.1)-mSA-Puro	lentiviraler Expressionsvektor für den Einzelkettenantikörper scFv(MR1.1)-mSA
pcz-VSV-G	lentiviraler Expressionsvektor für das Gag-Pol-Polyprotein von HIV-1, CMV-Promotor und Amp ^R
pCD/NL-BH	Expressionsvektor mit dem Env-Glykoprotein G des <i>Vesicular Stomatitis Virus</i> , CMV-Promotor und Amp ^R

3.1.10 Zelllinien

Tabelle 3.16: Verwendete Zelllinien

Name	Medium	Referenz	Eigenschaften
HEK293T	DMEM (komplett)	Graham et al., 1977,	immortalisierte, humane, embryonale Nierenkarzinomzelllinie mit stabil integriertem großen T-Antigen des <i>Simian Virus 40 (SV-40)</i>

Name	Medium	Referenz	Eigenschaften
HEK293T-EGFRvIII	DMEM (komplett)	Müller, 2014	stabile Expression des EGFRvIII nach Puromycin-Selektion
HEK293T-PSCA	DMEM (komplett)	Temme, Universitätsklinikum, Carl Gustav Carus, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Sektion Experimentelle Neurochirurgie/ Tumormimmunologie	stabile Expression des PSCA nach Zeocin-Selektion
HEK293T-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro	DMEM (komplett)	diese Arbeit	stabile Expression des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA nach Puromycin-Selektion
HEK293T-scFv(MR1.1)-mSA-Puro	DMEM (komplett)	diese Arbeit	stabile Expression des Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA nach Puromycin-Selektion
YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo	RPMI-1640 (komplett)	Syta, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Sektion Experimentelle Neurochirurgie/ Tumormimmunologie	Subklon der humanen NK-Zellleukämiezelllinie YT mit stabiler Expression der Biotinproteinligase BirA nach der Selektion mit Zeocin und des nicht-funktionellen Signalproteins DAP12 mit dem N-terminal angefügten Biotinakzeptor-peptid Kimura-BAP nach Puromycin-Selektion

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Restriktionsendonukleasespaltung

Der Ansatz, welcher für die Restriktionsendonukleasespaltung verwendet wurde, ist in der Tabelle 3.17 zu sehen. Es erfolgte eine Inkubation dieser Ansätze für eine Stunde bei 37 °C.

Tabelle 3.17: Restriktionsansatz

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen
Vektor	variabel	1 µg	variabel
Puffer	10x	1x	1 µl
Enzym	10 U/µl	0,5 - 2 U/µl	0,5 – 2 µl
ddH ₂ O			auf 10 µl auffüllen

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Eine Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um bei geschnittenen Vektoren festzustellen, ob bestimmte Sequenzen in diesen eingebaut worden sind.

Dafür wurde ein 1,5 %iges Gel, welches aus 60 ml 1x TAE-Puffer und 0,9 g Agarose besteht, verwendet. Nachdem die DNA-Proben mit 6x Loading Dye versetzt wurden, erfolgte die Auftrag dieser und des 1 kb DNA-Ladders als Größenstandard auf das Gel. Anschließend wurde das Gel bei 90 V ca. eine Stunde laufen gelassen.

3.2.3 Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenzen wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurden die Proben nach Angaben der Firma SeqLab Sequence Laboratories GmbH vorbereitet (siehe Tabelle 3.18) und durch diese Firma. Die erhaltene Sequenz wurde mit der zu erwartenden Sequenz mit Hilfe des „Open-Source“-Programms ApE A Plasmid Editor verglichen.

Tabelle 3.18: Sequenzierungsansatz

Komponente	Hinzugegebenes Volumen
Primer [30 pmol]	3 µl
Vektor [1,2 µg]	variabel
ddH ₂ O	auf 15 µl auffüllen

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinsynthese

Für die Herstellung der Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA bzw. scFv(MR1.1)-mSA wurden je zwei T175 Flaschen mit den entsprechenden HEK293T-Zellen, welche

diese Einzelkettenantikörper produzieren, ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumswechsel, bei dem kein oder für eine angenommene Biotinmenge von 12,5 µg/ml bzw. 50 µg/ml nach Herstellerangaben BioLock bzw. Avidin dem Zellkulturmedium hinzugegeben wurde (siehe Tabelle 3.19). Anschließend wurden die Zellen 3 Tage bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium mit den darin sekretierten Einzelkettenantikörpern abgenommen.

Tabelle 3.19: Zugabe von BioLock und Avidin pro 10 ml Medium

Angenommene Konzentration an Biotin	Volumen an BioLock pro 10 ml Medium	Volumen an Avidin pro 10 ml Medium
12,5 µg/l	1,67 µl	2,5 µl
50 µg/l	6,7 µl	10 µl

3.3.2 Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung der Einzelkettenantikörper wurde die Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA-Affinitätschromatographie) genutzt, bei der die Einzelkettenantikörper über ihren C-terminalen (His)₆-Tag an die Säule binden. Dies erfolgt mit den Ququick Ni-NTA Spin Columns von Qiagen.

Als erstes wurde der Kulturüberstand in ein 50-ml-Gefäß umgefüllt und abzentrifugiert (25 min, 4770 rpm, 4 °C). Im Anschluss erfolgt eine Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß. Die Säulen wurden zuerst mit 3-4 ml PBS und anschließend mit 0,5 ml Imidazol-Waschlösung I (siehe Tabelle 3.7) unter Vakuum äqualibriert. Danach erfolgte die Zugabe der Proteinsuspension. Im Anschluss wurde die Säule mit verschiedenen Konzentrationen von Imidazol gewaschen und nach jedem Waschen in ein neues Gefäß überführt. Zuerst wurde mit 500 µl Imidazol-Waschlösung I und anschließend mit 500 µl Imidazol-Waschlösung II (siehe Tabelle 3.7) gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4 °C für 10 Minuten. Danach wurden

500 µl Imidazol-Elutionslösung (siehe Tabelle 3.7) dazugegeben und es wurde erneut eine Zentrifugation bei 4.000 rpm, 4 °C für 10 Minuten durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Wiederholung des letzten Schrittes.

3.3.3 Dialyse

Die Dialyse wurde mit der Dialyse-Membran SpectraPro7 von Carl Roth GmbH & Co. KG durchgeführt. Diese diente zur Entfernung von Imidazolrückständen aus der Einzelkettenantikörperlösung nach der Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatografie.

Für die Dialyse wurden die Proteine in eine Dialyse-Membran gegeben und bei 4 °C in 4 Liter PBS für 2 Stunden inkubiert. Nach einer Wiederholung dieses Schrittes erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Dabei erfolgt ein Imidazol-Austausch mit PBS. Anschließend wurden die Proben wieder in Gefäße überführt und bei -20 °C eingefroren.

3.3.4 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinmenge in einer Lösung wird eine Proteinbestimmung mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific Inc. durchgeführt. Bei diesem BCA-Assay wurde die Biuret-Reaktion angewandt (Smith et al., 1985). Bei dieser Reaktion werden, wenn Proteine vorhanden sind, Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen reduziert, wobei die Menge proportional zur Proteinmenge in der Lösung ist. Diese Cu^{+} -Ionen gehen einen Komplex mit der Bicinchoninsäure (BCA) ein, welcher die violette Farbe der Lösung zur Folge hat. Bei 523 nm Wellenlänge kann das Absorptionsmaximum dieses Komplexes gemessen werden.

Dazu werden die Proteinproben 1:2 verdünnt und mit einem Standard auf eine 96-Well-Platte in Triplets mit je 25 µl aufgetragen und mit 200 µl BCA versetzt. Nach dem die Platte 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, erfolgt die Messung mit Hilfe des Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge mit einer Eichkurve, welche mit den Werten der Standards hergestellt wurde.

3.3.5 Milde Lyse

Um die Bindung der Einzelkettenantikörper an die YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen zu untersuchen wurde ein Zelllysats hergestellt und dieses in einem Western Blot aufgetragen.

Dafür wurden $1 \cdot 10^6$ YTS-NK-Zellen aus der Tabelle 3.16 in Röhrchen gegeben und bei 1170 rpm und 4 °C für 5 Minuten herunterzentrifugiert. Nach Wegwerfen des Überstandes wurden 20 µg des Einzelkettenantikörpers auf die Zellen gegeben und bei 4 °C eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl 0,5 % BSA in PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert (1170 rpm, 4 °C, 5 Minuten). Nach Wiederholen dieses Waschschrittes erfolgte eine Zugabe von 25 µl RIPA-Puffer, welcher mit Apoptin (1:500) und Leupeptin (1:500) versetzt wurde. Nach dieser Zugabe wurden die Proben auf Eis gelegt und dreimal alle 10 Minuten gevortext. Anschließend erfolgt ein Wegfrieren der Proben bei -80 °C über Nacht.

3.3.6 Diskontinuierliche

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) wurde angewendet, um anschließend mit diesem Gel eine Commasie-Färbung oder ein Western Blot durchzuführen. Die SDS-Page dient dabei der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

Für den Western Blot und die Commasie-Färbung wurden immer ein 5 %iges Sammelgel und ein 12 %iges Trenngel verwendet. Zuerst erfolgte die Herstellung des Trenngels, welches aus 2,5 ml Trenngelpuffer, 3,4 ml ddH₂O, 4 ml 30 %igem Acrylamid, 50 µl 20 %igem SDS, 80 µl %igem APS und 10 µl TEMED besteht. Dieses wurde bis zum Aushärten mit Isopropanol überschichtet, um einen geraden Gelabschluss zu erhalten. Im Anschluss wurde auf das Trenngel das Sammelgel gegossen, welches aus 0,6 ml Sammelgel-Puffer, 0,7 ml 30 % Acrylamid-Bis-Lösung, 25 µl 20 % SDS-Lösung, 50 µl 10 % APS-Lösung, 5 µl TEMED und 2,7 ml ddH₂O besteht, und ein Probenkamm eingesetzt. Währenddessen erfolgte eine Zugabe von 4x Laemmli-Puffer zu 10 µg der Proben mit anschließender Inkubation bei 95 °C für 10 Minuten. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurden die Proben und der Page Ruler Plus Prestained, welcher als Größenstandard diente, in die Kammern gegeben. Danach wurde das Gel zuerst für 20 Minuten bei 80 V und im Anschluss bei 120 V laufen gelassen.

3.3.7 Coomassie-Gel

Die Coomassie-Färbung wird verwendet, um unspezifische Proteine mit einer basischen Aminosäurekette zu färben.

Dafür wurde das Gel aus der SDS-Page zweimal mit TBS und einmal mit TBS-TT für 10 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit SimplyBlue SafeStain von Invitrogen für eine Stunde. Danach wurde erneut mit TBS und TBS-TT gewaschen und das Gel über Nacht in TBS stehen gelassen.

3.3.8 Western Blot

Um bestimmte Proteine in dem Gel nachzuweisen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dabei erfolgte die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel der SDS-Page auf eine PVDF-Membran (Whatman), was mit Hilfe des Trans-Blot Turbo Transfer System von Bio-Rad Laboratories GmbH geschah.

Für den Western-Blot wurden zuerst die PVDF-Membran und Filterpapiere zurecht geschnitten. Anschließend wurden die Filterpapiere in Puffer (Tabelle 3.8) getränkt, dabei

wurde in den Anoden-Puffer I und in den Anoden-Puffer II jeweils ein Filterpapier gegeben und in den Kathoden-Puffer zwei Filterpapiere. Anschließend erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran in Methanol. Zuerst wurde das mit Anodenpuffer I getränkte Filterpapier auf die Anodenplatte des Blottinggerätes gegeben, danach folgten das mit Anoden-Puffer II getränkte Filterpapier, die in Methanol aktivierte PVDF-Membran, das SDS-Gel und die zwei mit Kathoden-Puffer getränkten Filterpapiere. Am Schluss wurde die Kathodenplatte aufgelegt und bei 25 V für 45 Minuten erfolgte die Übertragung der Proteine auf die Membran.

3.3.9 PonceauS-Färbung

Durch die PonceauS-Färbung werden Proteine auf der PVDF-Membran aus dem Western-Blot sichtbar. Dafür wird die Membran zuerst zweimal mit TBS und einmal mit TBS-TT für

10 Minuten gewaschen. Anschließend wird die Membran in PonceauS-Solution von Sigma für 15 Minuten inkubiert und dreimal für 10 Minuten mit Reinstwasser gewaschen.

3.3.10 Protein-Detektion

Zur Identifikation von bestimmten Proteinen auf der PVDF-Membran werden primäre und sekundäre Antikörper verwendet, wobei der primäre Antikörper an die Proteine und der sekundäre Antikörper an den primären Antikörper bindet. Anschließend kann mit Hilfe einer speziellen Detektionslösung und eines Luminometers herausgefunden werden, wo der Sekundärantikörper gebunden hat. Dieser ist mit dem Reporterenzym Meerrettichperoxidase („Horse Raddish Peroxidase“, HRP) gekoppelt, was in der Lage ist das Substrat Luminol in der Detektionslösung Lumina Forte (Milipore, siehe 3.8) zu reduzieren, wobei er zu einer Chemolumineszenzfreisetzung kommt.

Die PVDF-Membran aus dem Western Blot wurde zunächst zweimal mit TBS und einmal mit TBS-TT für je 10 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 5 %iger Magermilch für eine Stunde, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Als nächstes wurde der primäre Antikörper in 10 ml 5 %iger Magermilch gelöst (siehe 3.3) und über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift der Membran zweimal mit TBS und einmal mit TBS-TT für je 5 Minuten. Auch der sekundäre Antikörper wurde in 5 %iger Magermilch gelöst im Verhältnis 1:1000 und für eine Stunde zu der Membran dazugegeben. Nach erneutem Waschen der Membran zweimal mit TBS und einmal mit TBS-TT für je 10 Minuten erfolgte die Zugabe der Detektionslösung Lumina Forte (Milipore). Im Anschluss wurde mit Hilfe des Luminometers LAS-3000 von FujiFilm Europa GmbH die Detektion durchgeführt.

3.3.11 „Stripping“ der PVDF-Membran

Nach dem ersten Detektieren der Membran erfolgte ein „Stripping“ dieser, um die primären und sekundären Antikörper wieder von den Proteinen zu lösen.

Dafür wurde die Membran in Stripping-Puffer (siehe Tabelle 3.8) gelegt und bei 55 °C für 60 Minuten in einem Wasserbad inkubiert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Inkubation der Zelllinien erfolgt bei 37 °C mit 5 %igem CO₂-Gehalt und 80 % Luftfeuchte in einem Brutschrank. Für die Suspensionszellen wurden stehende und für die adhärennten Zelllinien liegende Zellkulturflasche verwendet. Die Zellen wurden alle drei bis fünf Tage 1:100 oder 1:50 gesplittet. Bei den Suspensionszellen wurde die gewünschte Anzahl an Zellen in eine frische Mediumsflasche eingesät. Während die adhärennten Zellen vereinzelt wurden, wenn der Boden der Zellkulturflasche zu 80 - 100 % von einem konfluenten Zellrasen bewachsen wurde. Dafür wurde das verbrauchte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und anschließend wurde der Zellrasen vorsichtig mit PBS gespült. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erfolgte eine Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Tabelle 3.4) für drei Minuten. Für das Abstoppen der enzymatischen Reaktion, wurde die vierfache Menge an FKS-haltigem Medium hinzugegeben. Von dieser Zellsuspension wurde die gewünschte Menge in eine neue Zellkulturflasche gegeben.

3.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Zahl der lebenden Zellen zu bestimmen, wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. 10 µl der Trypanblau-Zellsuspension, welche aus 5 µl 0,4 %igem Trypanblau (siehe Tabelle 3.4) und 5 µl Zellsuspension besteht, wurden auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Durch dieses Trypanblau werden tote Zellen blau gefärbt. Anschließend folgte eine Zählung der lebenden Zellen, wobei die Zellzahl pro ml mit der folgenden Formel ermittelt wurde:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen in den 4 großen Quadraten}}{4} * \text{Verdünnungsfaktor (2)} * 10.000 = \text{Zellen/ml}$$

3.4.3 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin zur Generierung lentiviraler Partikel

Eine Transfektion ist das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Dafür wurde Polyethylenimin (PEI) verwendet. Das PEI bindet mit seinen positiv geladenen Aminosäureresten an der DNA und hilft dieser in die Zielzelle zu gelangen, indem das PEI an die Zellmembran bindet und mit Hilfe von Endozytose in die Zelle eingebracht wird. Anschließend wird die DNA aus dem Endosomen freigesetzt aufgrund des sogenannten „Proton-Sponge“-Effekts (Boussif et al., 1995). Die transiente Transfektion wurde in dieser Arbeit zur Generierung von lentiviralen Partikel unter Verwendung des Drei-Vektor-Systems nach Soneoka (Soneoka et al., 1995) eingesetzt.

Für die Transfektion wurden $4 \cdot 10^6$ HEK293T-Zellen in eine 10-cm-Schale gegeben. Für die Generierung viraler Partikel zur Herstellung der Einzelkettenantikörper-herstellenden Zelllinien wurden pro Einzelkettenantikörperkonstrukt zwei Schalen benötigt. Anschließend erfolgt die Inkubation der Zellen für ca. einen Tag.

Am nächsten Tag wurden pro Schale 45 μ l PEI und 955 μ l des DMEM(ohne)-Mediums zusammen gegeben. Außerdem erfolgte die Herstellung eines DNA-Mixes, welcher aus 5 μ g Expressionsplasmid-DNA und je 5 μ g der Verpackungsvektorplasmid-DNA pcz-VSV-G und pCD/NL-BH bestand. Dieser DNA-Mix wurde mit DMEM(ohne)-Medium auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt und anschließend wurde sowohl der DNA-Mix als auch der PEI-Mix für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den 5 Minuten erfolgte die Zugabe der PEI-Lösung zu dem DNA-Mix. Diese PEI-DNA-Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Währenddessen erfolgt eine Zugabe von 4 ml 15 %igem DMEM-Medium auf die HEK293T-Zellen. Anschließend wurden 2 ml der PEI-DNA-Lösung in die Schale dazugegeben. Als nächstes wurden die Schalen bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden 0,055 g Natriumbutyrat abgewogen und in 1 ml PBS gelöst. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 120 μ l der zuvor mit einem 0,2 μ m-Filter sterilfiltrierten Natriumbutyrat-Lösung für 8 Stunden. Nach dieser Zeit wurde ein Mediumswechsel mit 5 ml DMEM-Komplett-Medium durchgeführt und im Anschluss folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C mit 5 % CO₂-Gehalt. Der Viruspartikel-haltige Überstand wurde am nächsten Tag abgenommen und mit einem 0,45 μ m Filter filtriert, um Zellreste abzutrennen. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -4 °C im Kühlschrank.

3.4.4 Stabile Transduktion

Bei der stabilen Transduktion wird Fremd-DNA mit Hilfe von Viruspartikeln in eine Wirtszelle aufgenommen und in das Genom der Zielzelle integriert. Das Ergebnis ist eine dauerhafte Expression der eingebauten DNA.

Für die Transduktion wurden $5 \cdot 10^4$ HEK293T-Zellen in je ein Well einer 6-Wellplatte gegeben und bei 37 °C mit 5 %igem CO₂-Gehalt über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und 2,5 ml der unter 3.15 generierten Partikel sowie 2,5 µl Polybren hinzugegeben. Nach ca. einem Tag erfolgte eine Wiederholung dieses Schrittes. Im Anschluss erfolgte ein Mediumswechsel, wobei das Medium zu Selektionszwecken mit 10 µg/ml bzw. 12,5 µg/ml Puromycin versetzt wurde. Nach ca. 24 Stunden erfolgte das Absaugen des Mediums und es wurde neues Medium zur Inkubation bei 37 °C mit 5 % CO₂ zugegeben. Anschließend wurden die Zellen, die am vitalsten aus der Selektion hervorgingen, in eine T25-Flasche umgesiedelt und für die Antikörperproduktion verwendet.

3.4.5 Durchflusszytometrie

Um herauszufinden, ob die produzierten Einzelkettenantikörper an die entsprechenden Antigene auf der Tumorzelloberfläche bzw. an biotinylierte Rezeptoren auf den YTS-NK-Zellen binden, erfolgte eine Bindungsstudie mit dem Durchflusszytometer MACS Quant (Miltenyi Biotec GmbH). Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem Zellen in einer Suspension durch einen kontinuierlichen Hüllstrom fokussiert und einzeln von einem Laserstrahl erfasst werden. Dadurch entsteht eine Streuung des Lichts, welche von optischen Detektionssystemen erfasst wird und Informationen über die Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC) und die Größe einer Zelle (Vorwärtsstreulicht, FSC) gibt. Auch eine Messung der Emissionen von angeregten Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich. In dieser Arbeit wurde für die Messung das Durchflusszytometer MACS Quant (Miltenyi) und für die Auswertung die Analysesoftware FlowJo Version 10 (Tree Star) verwendet. Um die Bindung der Einzelkettenantikörper an die Zielzellen bzw. die YTS-Effektorzellen zu untersuchen, wurden spezifische Antikörper, die direkt an Fluoreszenzfarbstoffen gebunden waren, verwendet. Die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 3.2 gelistet.

Für die Durchflusszytometrie wurden die zu färbenden Zellen geerntet, abzentrifugiert (1170 rpm, 4 °C, 5 Minuten), mit 10 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation erfolgte eine Resuspendierung der Zellen in 8 ml PBS. Anschließend wurden 50 µl der Zellen 1:2 mit Trypanblau verdünnt und gezählt. Nachdem $4 \cdot 10^5$ Zellen in FACS-Gefäße überführt worden sind, wurden diese mit 500 µl 1 %igem BSA in PBS gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Zugabe der Einzelkettenantikörper (hu-scFv(AM1)-mSA bzw. scFv(MR1.1-mSA)) für eine Stunde bei 4 °C. Die Reaktion wurde mit 500 µl 1 %igem BSA in PBS gestoppt und erneut zentrifugiert (1170 rpm, 4 °C, 5 Minuten). Nachdem Wegwurf des Überstandes erfolgte die Zugabe der Antikörper, welche in der Tabelle 3.2 gelistet sind. Nach 10 Minuten Inkubation bei 4 °C im Dunklen erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 500 µl 1 %igem BSA in PBS. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C mit 1170 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden in 100 µl 1 %igem BSA in PBS resuspendiert. Am Schluss erfolgte die Messung mit dem

MACS-Quant Durchflusszytometer.

4 Ergebnisse

Auch wenn Krebs zum Beispiel mit Chemotherapien oder Operationen versucht wurde vollständig eliminiert zu werden, kann dieser erneut wachsen, da entweder nicht alle Krebszellen entfernt wurden oder in anderem Gewebe wachsen. Deshalb wird nach weiteren Therapieansätzen geforscht. Eine dieser Ansätze ist der Einsatz von Einzelkettenantikörpern, die zum einen spezifisch an Tumorzellen binden und zum anderen über fusioniertes monomeres Streptavidin an biotinyliert NK-Zellen gekoppelt werden können.

4.1 Generierung stabiler Zelllinien zur Produktion von hu-scFv(AM1)-mSA und scFv(MR1.1)-mSA

Für die Herstellung der Einzelkettenantikörper-produzierenden Zelllinien wurden die lentiviralen Expressionsvektoren pHATrick-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro und pHATrick-scFv(MR1.1)-mSA-Puro, welche bereits in der Praxisarbeit von mir hergestellt wurden, benötigt. Diese kodieren für den Einzelkettenantikörper, der gegen PSCA bzw. EGFRvIII gerichtet ist, fusioniert mit einem VSV-G-Tag, einem monomeren Streptavidin und einem His6-Tag (siehe Abbildung 4.1). Die Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA und scFv(MR1.1)-mSA, sollen spezifisch an die Tumorantigene PSCA beziehungsweise EGFRvIII binden und das monomere Streptavidin an die biotinylierten NK-Zellen. Der His6-Tag wird sowohl, wie der VSV-G-Tag, zur Detektion verwendet als auch zur Aufreinigung über die Nickel-NTA-Säule.

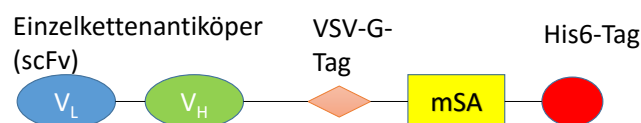


Abbildung 4.1: **Schematischer Aufbau der Einzelkettenantikörper (scFv)** Das Konstrukt besteht aus einem Einzelkettenantikörper, der gegen PSCA bzw. EGFRvIII gerichtet ist, fusioniert mit einem VSV-G-Tag, einem monomeren Streptavidin und einem His6-Tag.

4.1.1 Herstellung lentiviraler Partikel

Für die stabile Transduktion und somit für die Herstellung der Einzelkettenantikörper-produzierenden Zellen mittels der oben genannten lentiviralen Expressionsvektoren und

der beiden Verpackungsvektoren pCD/NL-BH und pcz-VSV-G über eine transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) von HEK293T-Zellen wurden lentiviralen Partikel hergestellt.

4.1.2 Stabile Transduktion

Die unter 4.1.1 generierten lentiviralen Partikel wurden für die stabile Transduktion von HEK293T-Zellen genutzt. Nach 2-tägiger Inkubation mit den lentiviralen Partikeln wurden die Einzelkettenantikörper-produzierenden Zelllinien HEK293T-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro und HEK293T-scFv(MR1.1)-mSA-Puro erfolgreich hergestellt und konnten selektiert werden.

4.1.3 Selektion

Um die unter 4.1.2. generierten Einzelkettenantikörper-produzierenden Zellen HEK293T-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro und HEK293T-scFv(MR1.1)-mSA-Puro von den HEK293T-Wildtyp-Zellen zu trennen, wurden die Zellen mit Puromycin selektioniert. Da die Einzelkettenantikörper-produzierenden Zellen auf Grund des eingebrachten lentiviralen Vektors eine Puromycin-Resistenz besitzen, starben nur die HEK293T-Wildtyp-Zellen.

Die Selektion wurde erfolgreich durchgeführt und die Einzelkettenantikörper-herstellenden Zelllinien HEK293T-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro und HEK293T-scFv(MR1.1)-mSA-Puro konnten für die folgenden Versuch verwendet werden.

4.2 Etablierung der Proteinproduktion

4.2.1 Proteinaufreinigung mit Nickel-NTA-Säulen

4.2.1.1 Western Blots des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA

Für die Produktion der Einzelkettenantikörper wurden $2 \cdot 10^6$ HEK293T-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro bzw. HEK293T-scFv(MR1.1)-mSA-Puro ausgesät und nach 24 Stunden Avidin bzw. BioLock bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 12,5 µg/ml dem Zellmedium zugegeben. Avidin und BioLock wurden benötigt, um das freie Biotin im Medium zu binden und so die Kopplung des Einzelkettenantikörpers an die Natürlichen Killerzellen zu gewährleisten. Zur Untersuchung, wie viel Protein-Medium-Lösung mit der Nickel-NTA-Säule maximal aufgereinigt werden darf, damit genug Proteine von der Säule gebunden werden ohne die Bindekapazität dieser zu überschreiten, wurden 30, 15, 10 und 5 ml der Protein-Medium-Lösung auf die Säule gegeben.

Zunächst wurde nur der Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA zur Austestung verwendet. Dessen Detektion im Western Blot erfolgte unter Verwendung der Antikörper anti-VSV-G bzw. anti-6x-His-Tag (siehe Tabelle 3.3). Die Abbildungen 4.2 und 4.3 zeigen die Western Blots, bei denen verschiedene Volumina der Protein-Medium-Lösung über die Nickel-NTA-Säule aufgereinigt wurden. Die Einzelkettenantikörper wurden dabei mit Avidin (Abbildung 4.2) bzw. BioLock (Abbildung 4.3) zur Biotinbindung während der Einzelkettenantikörperproduktion versetzt.

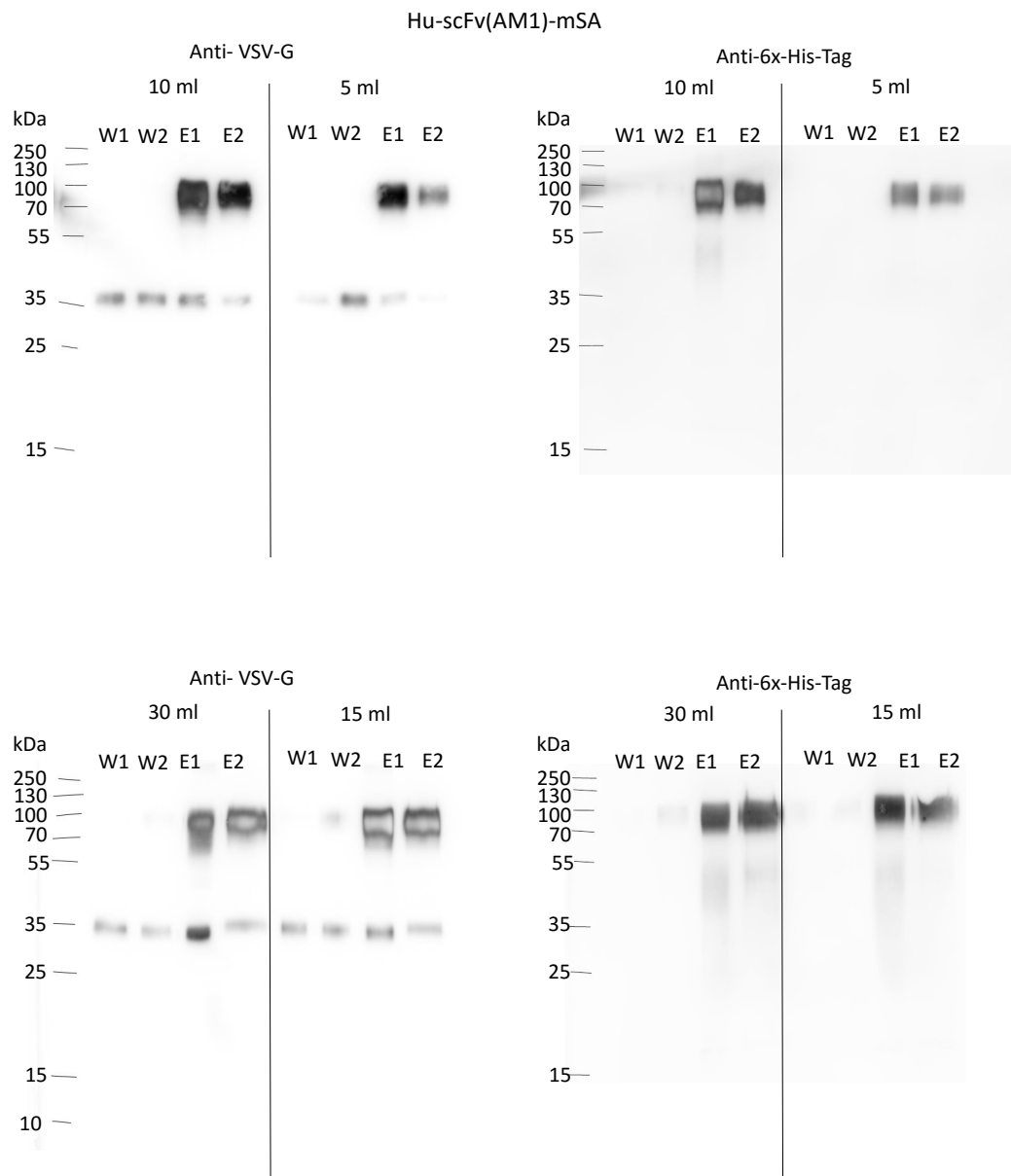


Abbildung 4.2: **Western Blot des mit Avidin versetzten Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA.** Die Untersuchung des hu-scFv(AM1)-mSA (52 kDa), welcher mit Avidin versetzt wurde, erfolgte mittels Western Blot-Analyse bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2). Pro Waschschritt bzw. Elutionsschritt wurden je 2 µg Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels des VSV-G-Antikörpers (1:8000) bzw. His-Antikörpers (1:1000), an dem ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper gebunden hat.

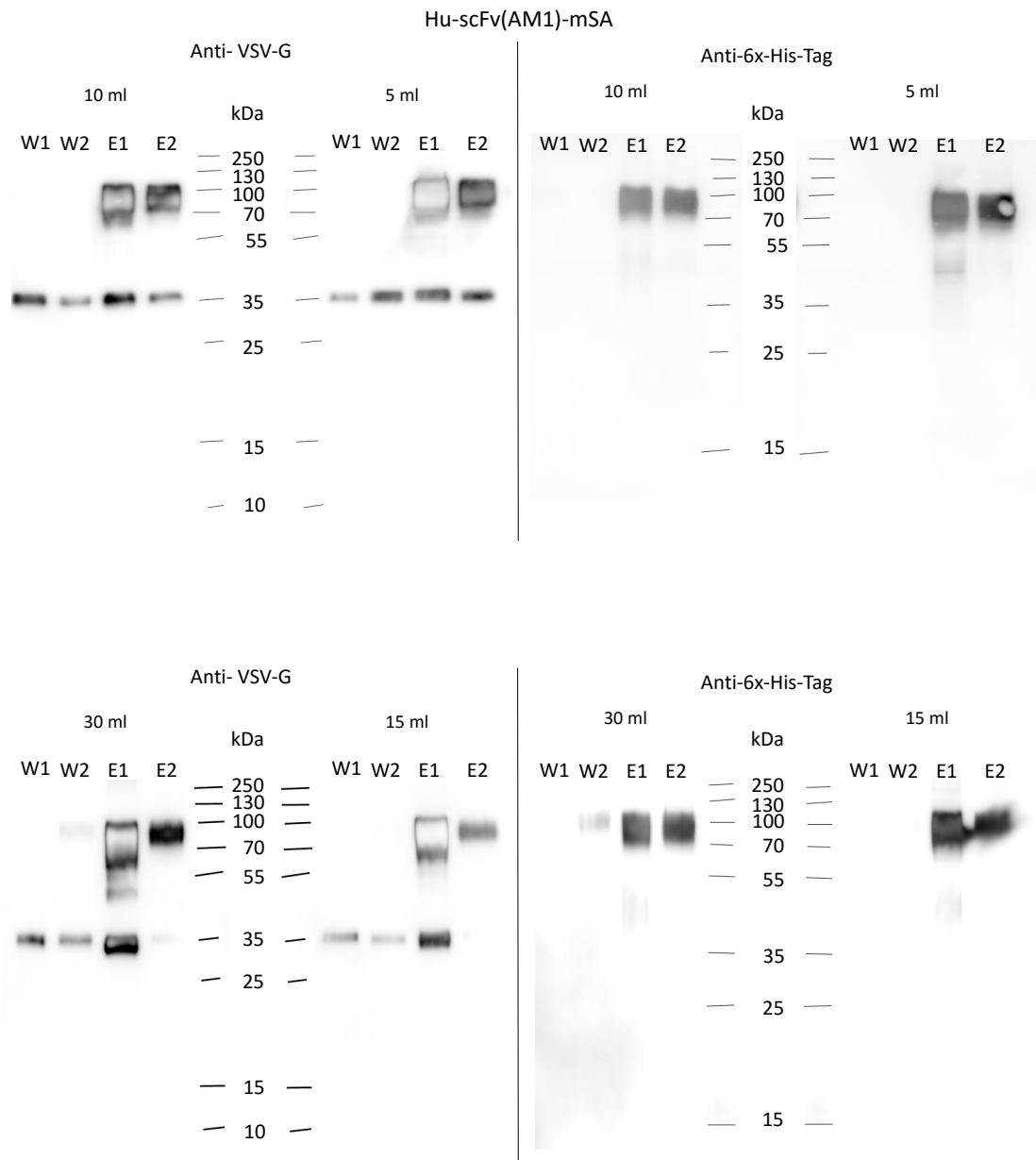


Abbildung 4.3: **Western Blot des mit BioLock versetzten Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA.** Die Untersuchung des hu-scFv(AM1)-mSA (52 kDa), welcher mit BioLock versetzt wurde, erfolgte mittels Western Blot-Analyse bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2). Pro Waschschrift bzw. Elutionsschritt wurden je 2 µg Protein aufgetragen. Die Detektion mittels des VSV-G-Antikörpers (1:8000) bzw. His-Antikörpers (1:1000), an dem ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper gebunden hat.

Die Abbildungen 4.2 und 4.3 zeigen bei den Western Blots, die mit dem VSV-G-Antikörper analysiert wurden, bei jedem Wasch- und Elutionsschritt eine schwache Bande bei ca. 35 kDa. Die Elutionen sowohl mit Avidin- als auch mit BioLock-Zugabe bei der Einzelkettenantikörperproduktion, zeigten außerdem zwischen 70 kDa und 100 kDa eine starke Bande. Diese Bande war auch mit dem Antikörper, der gegen den His6-Tag gerichtet ist,

zu erkennen. Jedoch waren die Banden bei ca. 35 kDa nicht mit dem His6-Antikörper zu detektieren. Bei allen Abbildungen wurde bei der zu erwartenden Größe der Einzelkettenantikörper von ca. 52 kDa keine Bande detektiert.

Tabelle 4.1: Proteinkonzentrationen in $\mu\text{g/ml}$ der Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritte (E1, E2) bei Zugabe verschiedener Volumina des mit Avidin hergestellten Einzelkettenantikörpers zur Nickel-NTA-Säule

	5 ml	10 ml	15 ml	30 ml
W1	1824	1067	870	849
W2	82	165	290	244
E1	417	285	457	429
E2	235	163	41	47

Tabelle 4.2: Proteinkonzentrationen in $\mu\text{g/ml}$ der Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritte (E1, E2) bei Zugabe verschiedener Volumina des mit BioLock hergestellten Einzelkettenantikörpers zur Nickel-NTA-Säule

	5 ml	10 ml	15 ml	30 ml
W1	930	623	1068	1004
W2	179	277	92	240
E1	107	287	297	457
E2	164	162	35	0

Die Tabellen 4.1 und 4.2 zeigen die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritte (E1, E2). Die Waschschrte enthalten Verschmutzungen, wie ungebundenen Proteine und andere Mediumbestandteile, die durch diese Waschschrte von der Säule gewaschen wurden. Bei dem Elutionsschritten (E1, E2) wurden an die Säule gebundene Proteine, wie der mit einem His6-Tag fusionierte Einzelkettenantikörper, von dieser herunter gewaschen.

Die Tabellen 4.1 und 4.2 zeigen, dass unabhängig vom Volumen bei dem Waschschr 1 und Elutionsschr 1 die Proteinkonzentrationen höher waren als bei dem Waschschr 2 bzw. dem Elutionsschr 2.

Die Proteinkonzentration, der unter Zugabe von Avidin produzierten Einzelkettenantikörper (siehe Tabelle 4.1) waren bei dem Elutionsschr 1 mit Ausnahme der Säule, bei der 10 ml der Protein-Medium-Lösung aufgereinigt wurde, nahezu gleich. Die Proteinkonzentrationen sowohl des Elutionsschritts 2 als auch des Waschschritts 1 sanken stattdessen mit steigendem Volumen. Wohingegen die Proteinkonzentration beim

Waschschritt 2 mit größerem Volumina stieg außer bei der Säule, über die 30 ml der Protein-Medium-Lösung aufgereinigt wurde.

Die Proteinkonzentrationen im Elutionsschritt 1 des unter Zugabe von BioLock produzierten Einzelkettenantikörpers (siehe Tabelle 4.2) stiegen mit zunehmendem Volumen, wohingegen die im Elutionsschritt 2 sanken. Bei den Waschschritten 1 und 2 wurden jedoch kaum Proteinkonzentrationsänderungen mit steigendem Volumen beobachtet.

4.2.1.2 Western Blot des Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA

$2 \cdot 10^5$ Zellen der Einzelkettenantikörper-produzierenden Zelllinie HEK293T-scFv(MR1.1)-mSA wurde in eine T175-Flasche ausgesät und nach 24 Stunden mit Avidin bzw. BioLock bei einer angenommenen Biotin-Konzentration von $12,5 \mu\text{g/ml}$ für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Um sicher zu gehen, dass genug Proteine an die Säule binden und gleichzeitig die Bindungskapazität der Säule nicht überschritten wird, wurden 30 ml der Protein-Medium-Lösung über die Nickel-NTA-Säule aufgereinigt. Die Abbildung 4.4 zeigt den Western Blot dieser Aufreinigung.

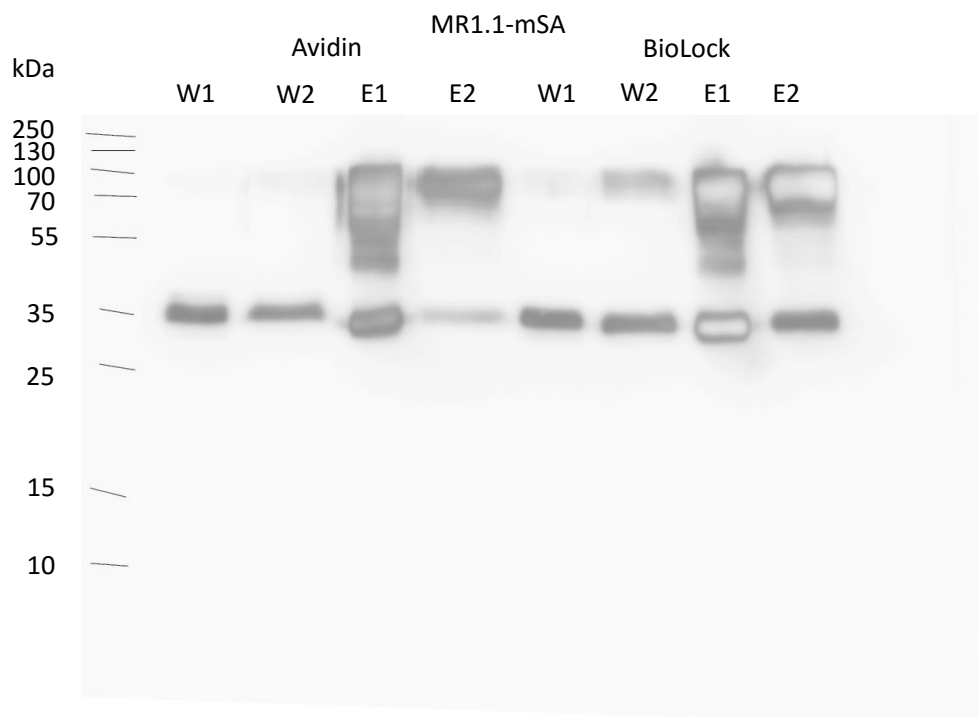


Abbildung 4.4: **Western Blot des mit Avidin bzw. BioLock versetzten Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA.** Die Untersuchung des scFv(MR1.1)-mSA (52 kDa), welcher mit Avidin oder BioLock versetzt wurde, erfolgte mittels Western Blot-Analyse bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2). Pro Waschschritt bzw. Elutionsschritt wurden je $10 \mu\text{g}$ Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte durch einen VSV-G-Antikörper (1:5000), an dem ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper gebunden hat.

In der Abbildung 4.4 war eine leichte Bande bei ca. 100 kDa vom Waschschrift 2 des mit BioLock versetzten Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA zuerkennen. Auch in den Elutionsschritten bei dem mit Avidin und BioLock produzierten Einzelkettenantikörper wurde diese Bande gesehen. Des Weiteren zeigten alle Wasch- und Elutionsschritte bei ca. 35 kDa eine Bande. Bei der zu erwartenden Größe des Einzelkettenantikörpers von ca. 52 kDa war keine Banden zu erkennen.

4.2.2 Coomassie Gele und PonceauS-Färbung

Um zu zeigen, dass die Antikörper durch die Nickel-NTA-Säule von Verunreinigungen befreit wurden, erfolgte eine Inkubation des Gels mit SimplyBlue SafeStain. Diese Lösung bindet an die basischen Aminosäureketten der Proteine in dem Gel, wodurch die blauen Banden entstehen. Die Abbildung 4.5 zeigt das gefärbte Coomassie-Gel des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA und die Abbildung 4.6 des scFv(MR1.1)-mSA. Die aufgetragenen Einzelkettenantikörper wurden unter Zusatz von Avidin bzw. BioLock bei einer angenommenen Biotin-Konzentration von 12,5 µg/ml hergestellt.

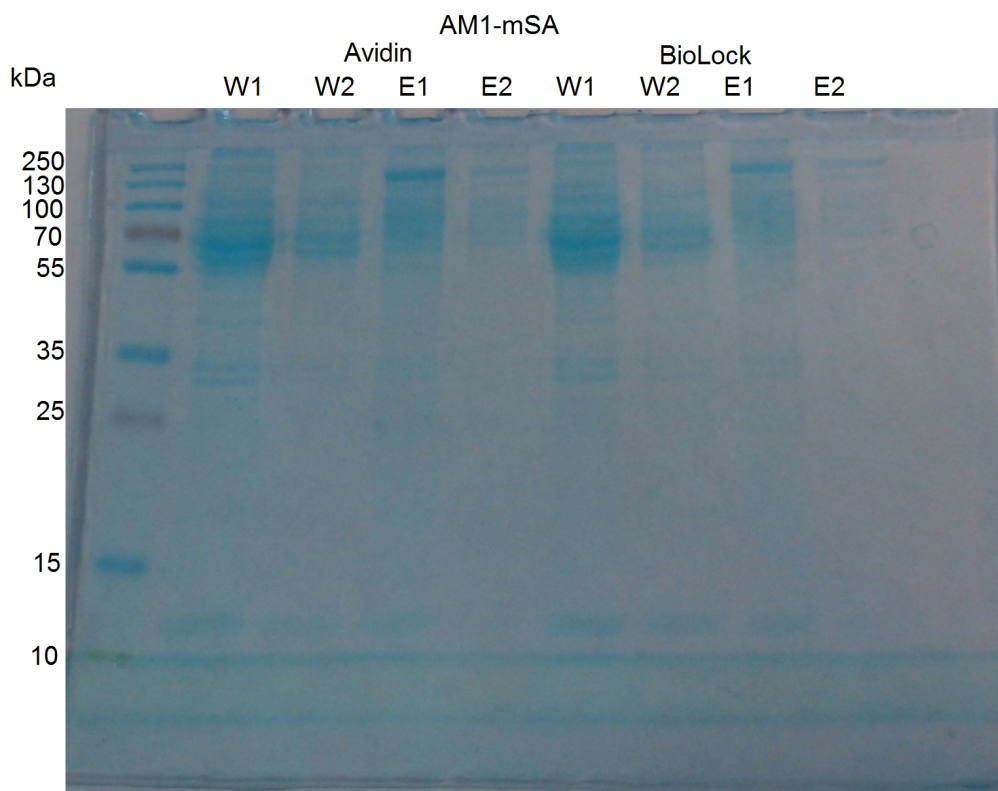


Abbildung 4.5: **Mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel des mit Avidin oder BioLock versetzten Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA.** Die Analyse des hu-scFv(AM1)-mSA (52 kDa), erfolgte bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2). Es wurden 10 µg Protein aufgetragen.

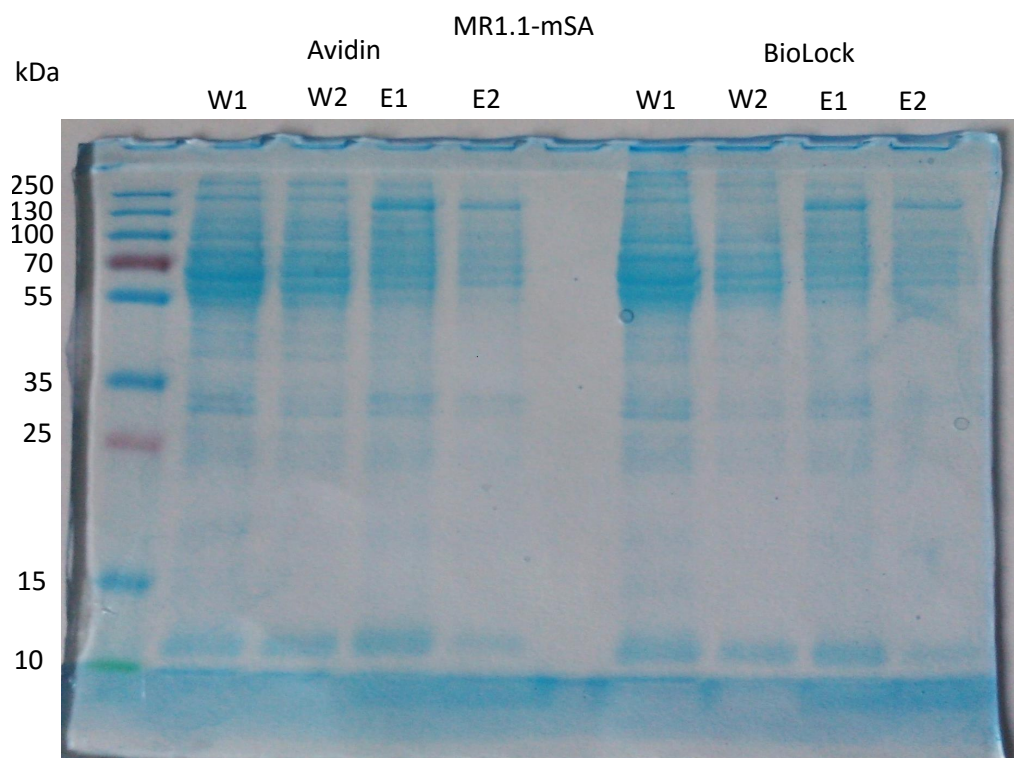


Abbildung 4.6: **Mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel des mit Avidin oder BioLock versetzten Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA.** Die Analyse des scFv(MR1.1)-mSA (52 kDa) erfolgte bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2). Es wurden 10 µg Protein aufgetragen.

Die Waschschrte 1 und 2 des mit Avidin und BioLock versetzten Einzelkettenantikörpern hu-scFv(AM1)-mSA und scFv(MR1.1)-mSA zeigten viele Banden besonders zwischen 55 kDa und 100 kDa. Der Elutionsschritt 1 aller Einzelkettenantikörpern hatte bei ca. 35 kDa und zwischen 55 kDa und 130 kDa Banden. Wohingegen bei dem Elutionsschritt 2 nur schwache Banden aber auf der gleichen Höhe wie bei dem Elutionsschritt 1 zusehen waren. Die vielen Banden zwischen 55 kDa und 130 kDa in den Elutionsschritten des Coomassie-Gels weisen somit auf eine Verunreinigung des Antikörpers mit Mediumkomponenten hin.

Um die Übertragung der Proteine auf die Membran nachzuweisen, wurde eine PonceauS-Färbung der PVDF-Membran durchgeführt (3.3.9). Dabei erfolgte eine Inkubation der Membran mit PonceauS-Lösung für 15 Minuten und im Anschluss erfolgte ein Waschen der gefärbten Membran. Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen die mit PonceauS gefärbte Membran des unter Avidin- bzw. BioLock-Zugabe produzierten Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA bzw. scFv(MR1.1)-mSA bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2).

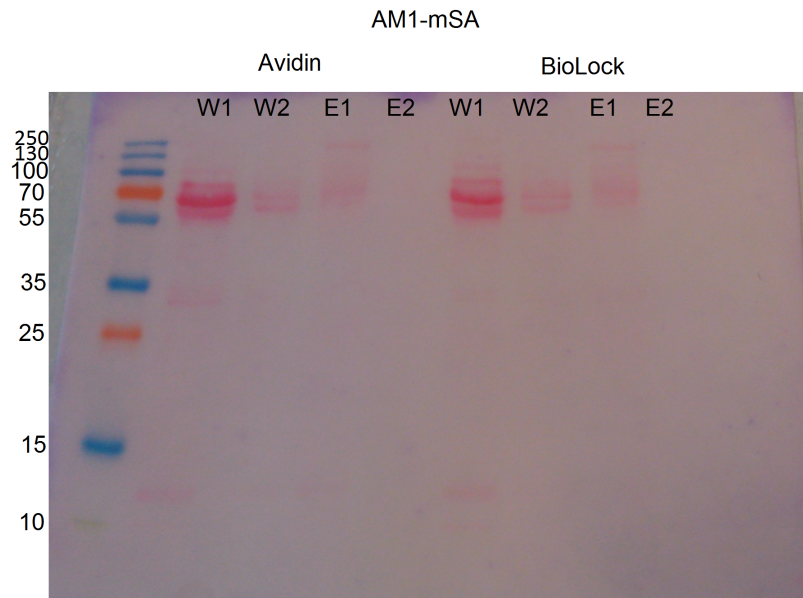


Abbildung 4.7: **Mit PonceauS gefärbte PVDF-Membran des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA.** Die Analyse des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2). Es wurden 10 µg Protein aufgetragen.

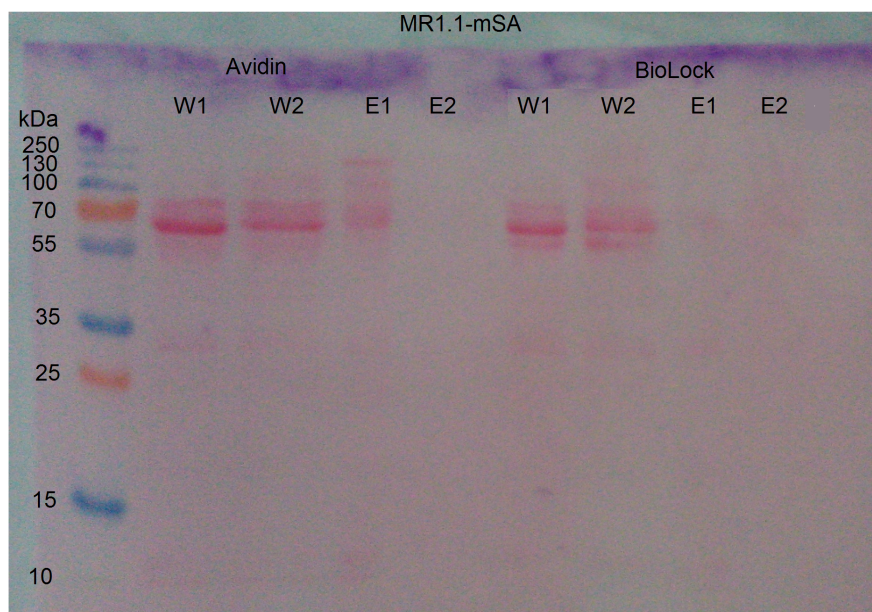


Abbildung 4.8: **Mit PonceauS gefärbte PVDF-Membran des Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA.** Die Analyse des Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA, welcher mit Zusatz von Avidin bzw. BioLock hergestellt wurde, bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2). Es wurden 10 µg Protein aufgetragen.

Auch bei den Abbildungen 4.7 und 4.8 wurde bei dem Waschschritten 1 der beiden Einzelkettenantikörper zwischen 50 kDa und 70 kDa eine starke Bande detektiert. Diese Bande war bei dem Waschschriff 2 des Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA auch zu erkennen, wenn auch nur schwach. Der Elutionsschritt 1 hingegen zeigte mit Ausnahme des mit BioLock produzierten scFv(MR1.1)-mSA neben Banden bei 70 kDa bis 100 kDa noch eine Bande bei ca. 130 kDa, wohingegen der Elutionsschritt 2 bei allen Einzelkettenantikörpern keine Banden zeigte. Jedoch waren die erwartenden Banden bei ca. 52 kDa auf keiner der Abbildungen zu sehen.

4.2.3 Untersuchung der Antikörperproduktion und -aufreinigung bei Verwendung von großen Mengen an BioLock oder Avidin

Da keine der Banden auf den Abbildungen 4.1 bis 4.3 die zu erwartenden Größe von 52 kDa aufweist, wurde die Einzelkettenantikörperproduktion des hu-scFv(AM1)-mSA bei Zugabe von Avidin oder BioLock bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 50 µg/ml ausgetestet. Bei der Western Blot-Analyse wurde der VSV-G-Antikörper zu Detektion des Einzelkettenantikörpers eingesetzt.

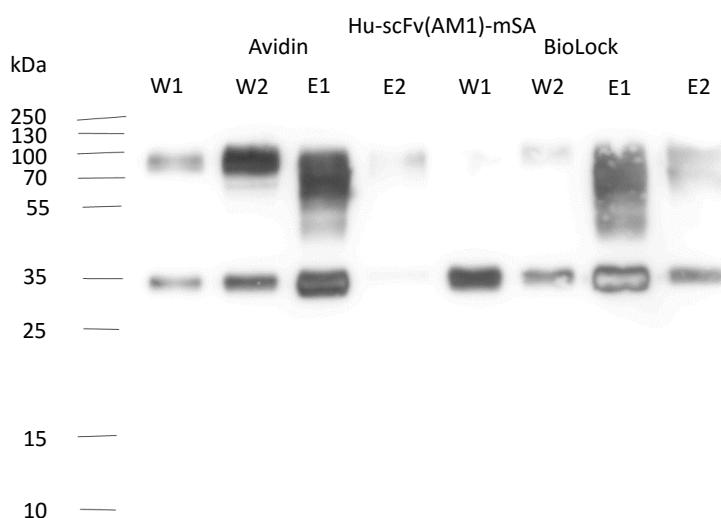


Abbildung 4.9: **Western Blot des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA bei der Verwendung hoher Avidin- bzw. BioLock-Konzentrationen (50 µg/ml).** Die Untersuchung des hu-scFv(AM1)-mSA (52 kDa) erfolgte mittels Western Blot-Analyse bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2). Pro Waschschriff bzw. Elutionsschritt wurden je 5 µg Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels des VSV-G-Antikörpers (1:6000), an den ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper (1:1000) gebunden hat. Bei der Einzelkettenantikörperherstellung wurden entweder Avidin oder BioLock bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 50 µg/ml hinzugegeben.

Die Abbildung 4.9 zeigt den Western Blot des unter Zugabe von Avidin- bzw. BioLock bei einer angenommenen Biotin-Konzentration von 50 µg/ml hergestellten Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA. Dabei wurden 30 ml der Protein-Medium-Lösung mit Hilfe einer Nickel-NTA-Säule aufgereinigt. Die Abbildung zeigte bei beiden Waschschritten (W1, W2) und bei beiden Elutionsschritten (E1, E2) des mit Avidin produzierten Einzelkettenantikörpers eine starke Bande zwischen 70 kDa und 100 kDa. Bei dem unter BioLock-Zugabe hergestellten Einzelkettenantikörper war bei dem Waschschrift 2 nur eine leichte Bande zwischen 70 kDa und 100 kDa zu erkennen. Jedoch hatten beide Elutionsschritte diese Bande. Mit Ausnahme des Elutionsschritts 2 (E2) des mit Avidin produzierten Antikörpers war in allen Spuren eine Bande bei ca. 35 kDa zu erkennen. Es wurde jedoch keine Bande bei der zu erwartenden Größe des Einzelkettenantikörpers von 52 kDa beobachtet.

4.2.4 Untersuchung der Antikörperproduktion und -aufreinigung ohne Verwendung von BioLock oder Avidin

Da auch bei der Verwendung von hohen Avidin- und BioLock-Konzentrationen (50 µg/ml) bei der Einzelkettenantikörperproduktion keine Bande bei ca. 52 kDa zu erkennen war, wurde bei der Herstellung neuer hu-scFv(AM1)-mSA Einzelkettenantikörper kein Avidin bzw. BioLock dem Zellkulturmedium hinzugegeben. Bei der Detektion wurde erneut der VSV-G-Antikörper verwendet.

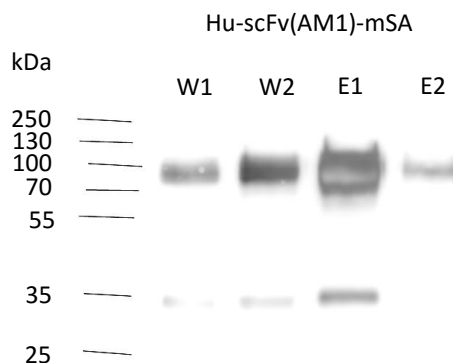


Abbildung 4.10: **Western Blot des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA ohne Verwendung von Avidin bzw. BioLock.** Die Untersuchung des hu-scFv(AM1)-mSA (52 kDa), erfolgte mittels Western Blot bei verschiedenen Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritten (E1, E2). Pro Waschschrift bzw. Elutionsschritt wurden je 5 µg Protein aufgetragen. Die Detektion wurde mit einem VSV-G-Antikörper (1:6000), an dem ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper (1:1000) gebunden hat, durchgeführt. Bei der Einzelkettenantikörperherstellung wurde kein Avidin bzw. BioLock hinzugegeben.

Die Abbildung 4.10 zeigt den ohne Avidin bzw. BioLock-Zugabe hergestellten Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA. Bei allen Wasch- und Elutionsschritten des Einzelkettenantikörpers war zwischen 70 kDa und 100 kDa eine Bande zu erkennen. Bei W2 und E1 wurden zusätzlich noch bei ca. 35 kDa eine schwache Bande beobachtet. Bei der zu erwartenden Größe des Einzelkettenantikörpers von ca 52 kDa wurde keine Bande detektiert.

4.3 Untersuchung der Bindung an die Zieltumorzellen

Um die Bindung der Einzelkettenantikörper an die speziellen Antigene der Tumorzellen zu untersuchen, wurden HEK293T-PSCA für den hu-scFv(AM1)-mSA und HEK293T-EGFRvIII für den scFv(MR1.1)-mSA verwendet. Dazu wurden 10 µg der Einzelkettenantikörper auf $2 \cdot 10^5$ Zellen gegeben und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit His-PE oder Biotin-PE gefärbt. Diese Fluorochromgekoppelten Antikörper können vom Durchflusszytometer MACS Quant (Miltenyi) detektiert werden. Bei der Einzelkettenantikörperherstellung wurde Avidin bzw. BioLock bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 12,5 µg/ml oder 50 µg/ml dem Zellkulturmedium hinzugegeben. Als Positivkontrolle, ob die HEK293T-EGFRvIII-Zellen den epidermalen Wachstumsrezeptor Variante III auf ihrer Oberfläche exprimieren, fand der in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Einzelkettenantikörper scFv(MR1.1)-KiBAP Verwendung. Die Abbildungen 4.11 bis 4.15 zeigen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie.

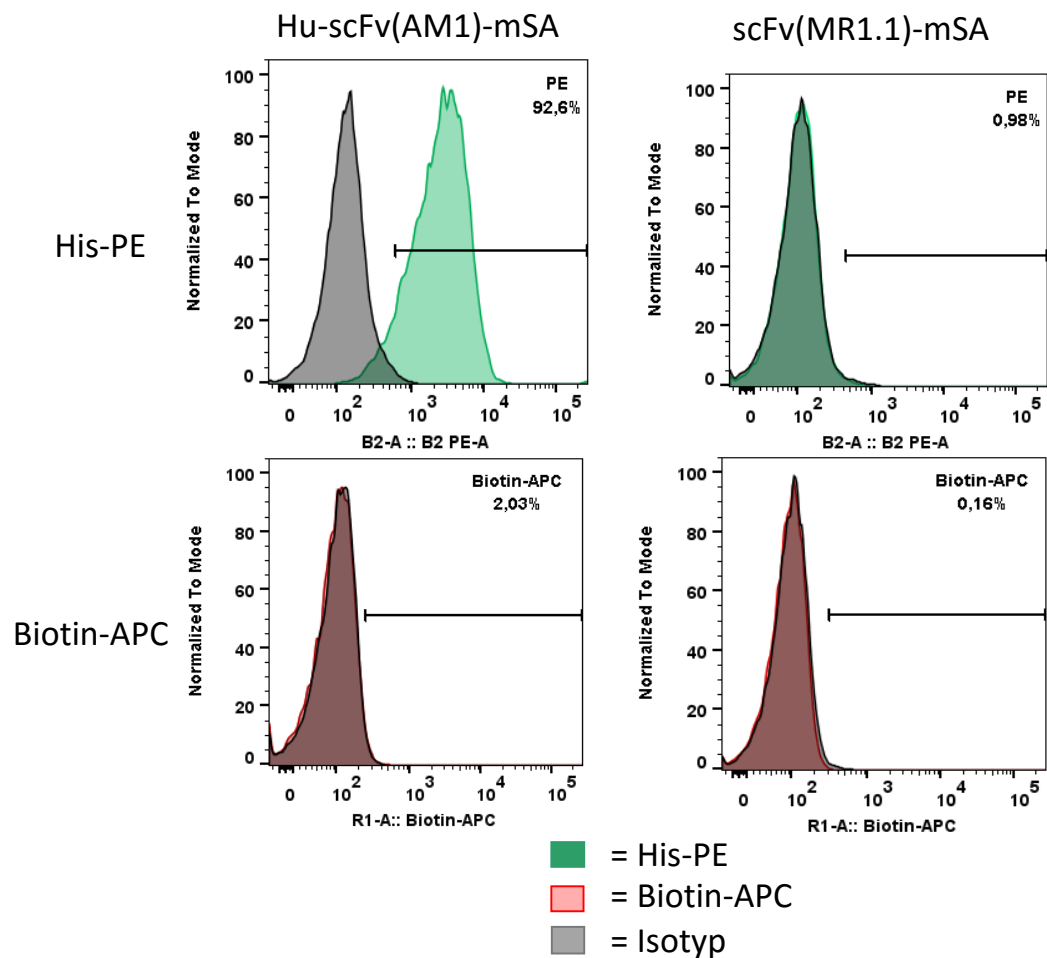


Abbildung 4.11: **Bindungsstudie der mit Avidin produzierten Einzelkettenantikörper an die Tumorzellen.** Dabei wurden HEK293T-PSCA-Zellen bzw. HEK293T-EGFRvIII-Zellen verwendet, um die Bindung und die Biotinylierung der Einzelkettenantikörper an die Zielzellen zu untersuchen. Um dies zu zeigen, wurden die Antikörper His-PE bzw. Biotin-APC (siehe Tabelle 3.3) verwendet.

In Abbildung 4.11 hatte der hu-scFv(AM1)-mSA zu 92,6 % an den HEK293T-PSCA-Zellen gebunden und nur 2,03 % der gebundenen Einzelkettenantikörper waren biotinyliert. Der scFv(MR1.1)-mSA hatte nicht an die HEK293T-EGFRvIII-Zellen gebunden.

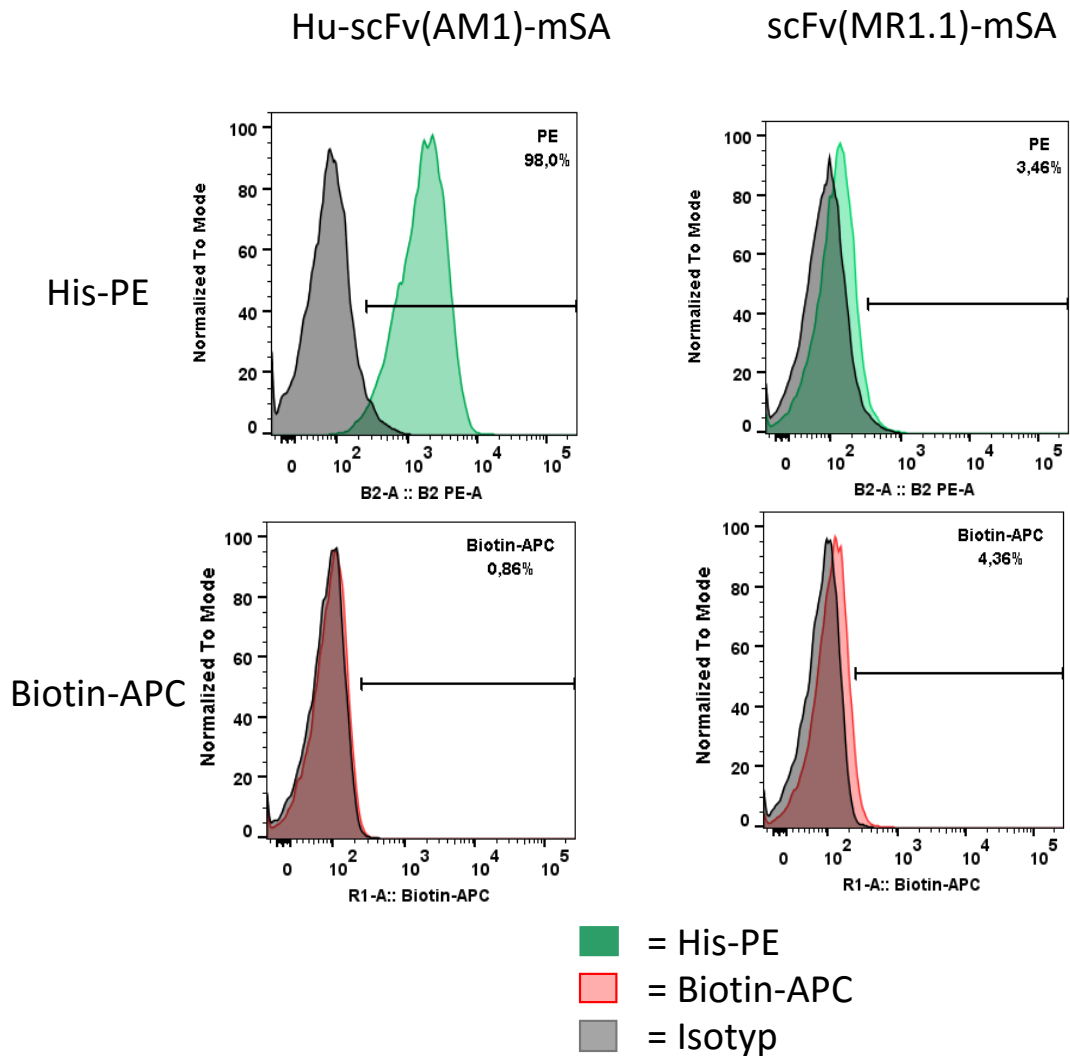


Abbildung 4.12: **Bindungsstudie der mit BioLock produzierten Einzelkettenantikörper an die Tumorzellen.** Dabei wurden HEK293T-PSCA-Zellen bzw. HEK293T-EGFRvIII-Zellen verwendet, um die Bindung und die Biotinylierung der Einzelkettenantikörper an die Zielzellen zu untersuchen. Um dies zu zeigen, wurden die Antikörper His-PE bzw. Biotin-APC (siehe Tabelle 3.3) verwendet.

In der Abbildung 4.12 band der hu-scFv(AM1)-mSA, der bei Zugabe von BioLock produziert wurde, zu 98,0 % an die Antigene der Tumorzellen. Die Biotinylierung der gebundenen Antikörper betrug 0,86 %. Der scFv(MR1.1)-mSA hatte nur zu 3,46 % an die HEK293T-EGFRvIII-Zellen gebunden und war zu 4,36 % biotinyliert.

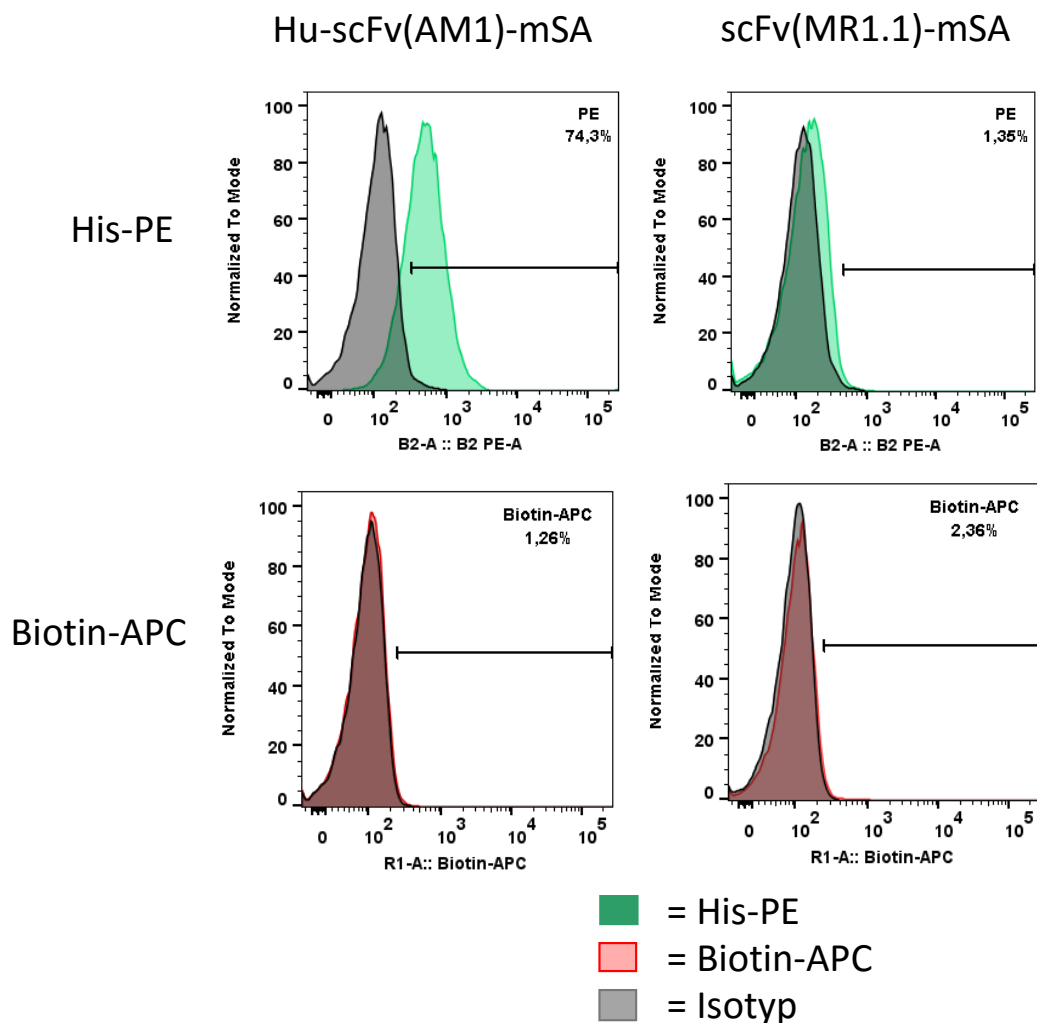


Abbildung 4.13: **Bindungsstudie der Einzelkettenantikörper mit hoher Avidin-Konzentration an die Tumorzellen.** Dabei wurden HEK293T-PSCA-Zellen bzw. HEK293T-EGFRvIII-Zellen verwendet, um die Bindung und die Biotinylierung der Einzelkettenantikörper an die Zielzellen zu untersuchen. Um dies zu zeigen, wurden die Antikörper His-PE bzw. Biotin-APC (siehe Tabelle 3.3) verwendet. Bei der Herstellung erfolgte eine Zugabe von Avidin bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 50 µg/ml.

Die Abbildung 4.13 zeigt die Bindung der Einzelkettenantikörper, welche unter Zugabe von 50 µg/ml Avidin produziert wurden. Der hu-scFv(AM1)-mSA hat zu 74,3 % an die HEK293T-PSCA-Zellen gebunden und war zu 1,26 % biotinyliert. Der scFv(MR1.1)-mSA, hatten zu 1,35% an die HEK293T-EGFRvIII-Zellen gebunden und war zu 2,36 % biotinyliert.

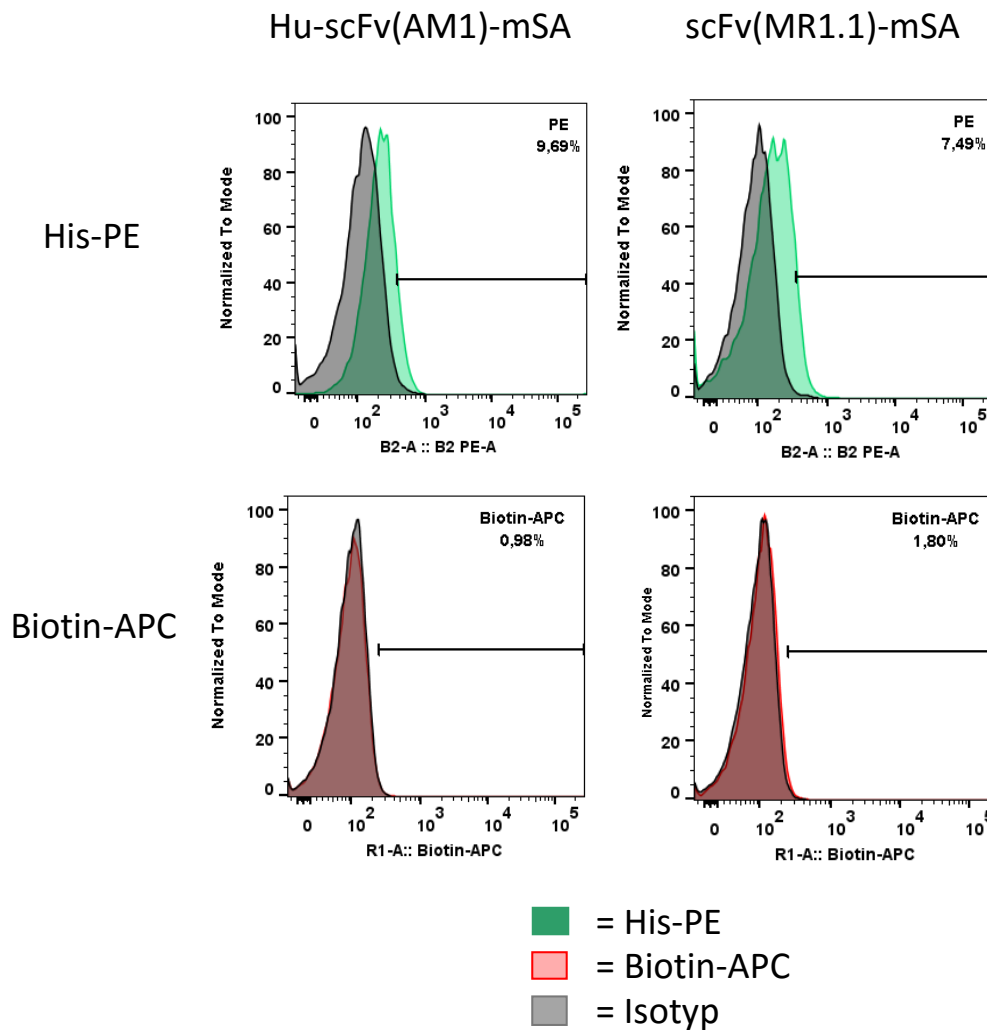


Abbildung 4.14: **Bindungsstudie der Einzelkettenantikörper mit hoher BioLock-Konzentration an die Tumorzellen.** Dabei wurden HEK293T-PSCA-Zellen bzw. HEK293T-EGFRvIII-Zellen verwendet, um die Bindung und die Biotinylierung der Einzelkettenantikörper an die Zielzellen zu untersuchen. Um dies zu zeigen, wurden die Antikörper His-PE bzw. Biotin-APC (siehe Tabelle 3.3) verwendet. Bei der Herstellung erfolgte eine Zugabe von BioLock bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 50 µg/ml.

Die unter Verwendung von hohen BioLock-Konzentrationen (50 µg/ml) produzierten hu-scFv(AM1)-mSA Einzelkettenantikörper banden zu 9,69 % an die Tumorzellen und waren nicht biotinyliert (siehe Abbildung 4.14). Der scFv(MR1.1)-mSA wiederum hatte zu 7,49 % an die Antigene der Tumorzellen gebunden und die Biotinylierung der gebundenen Einzelkettenantikörper betrug 1,80 %.

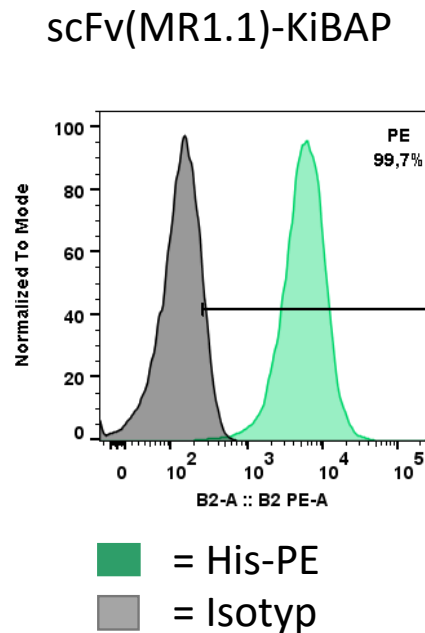


Abbildung 4.15: **Bindungsstudie des scFv(MR1.1)-KiBAP als Positivkontrolle an die Tumorzellen.** Dabei wurden HEK293T-EGFRvIII-Zellen verwendet, um die Bindung des scFv(MR1.1)-KiBAP an die Zielzellen zu untersuchen. Um dies zu zeigen, wurde der Antikörper His-PE (siehe Tabelle 3.3) verwendet.

Um auszuschließen, dass die fehlende Bindung des scFv(MR1.1)-mSA an die HEK293T-EGFRvIII-Zellen auf eine schwache EGFRvIII-Expression zurückzuführen ist, wurde eine Positivkontrolle eingesetzt. Der in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Einzelkettenantikörper scFv(MR1.1)-KiBAP, der das gleiche Epitop wie der scFv(MR1.1)-mSA erkennt, hatte zu 99,7 % an den HEK293T-EGFRvIII-Zellen gebunden (siehe Abbildung 4.15).

4.4 Untersuchung der Bindung an die Effektorzellen

Für die weiteren Untersuchungen wurde nur der hu-scFv(AM1)-mSA verwendet, da dieser an die Antigene der Tumorzellen band im Gegensatz zu dem scFv(MR1.1)-mSA. Um die Bindung des Einzelkettenantikörpers an die Effektorzellen zu untersuchen, wurde der Einzelkettenantikörper mit den YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen inkubiert, da diese den biotinylierbaren Signaladapter Δ DAP12-KiBAP besitzen. Wenn dieser Signaladapter mittels der Biotin-Protein-Ligase BirA, die ebenfalls von dieser

YTS-NK-Zelllinie exprimiert wird, biotinyliert wurde, kann ein noch nicht an ein Biotin gebundenes monomeres Streptavidin an diesen binden. Der über das monomere Streptavidin gebundene Einzelkettenantikörper kann dann über seinen His6-Tag bzw. VSV-G-Tag nachgewiesen werden. Dafür wurden die oben beschriebenen YTS-NK-Zellen eine Stunde bei 4 °C mit dem Einzelkettenantikörper inkubiert. Anschließend erfolgte entweder die Zugabe von Antikörpern für die Durchflusszytometrie oder die Lyse der YTS-NK-Zellen und die anschließende Durchführung eines Western Blots mit den hergestellten Zelllysaten.

4.4.1 Durchflusszytometrische Analyse

Nach dem $4 \cdot 10^5$ YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen mit 8 μ g des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA inkubiert wurden, erfolgte eine Inkubation mit den Antikörper für die Durchflusszytometrie. Zunächst wurden YTS-Zellen mit anti-Biotin-Antikörpern gefärbt, um die Biotinylierung dieser, welche eine Voraussetzung für die Bindung des Einzelkettenantikörpers ist, zu überprüfen.

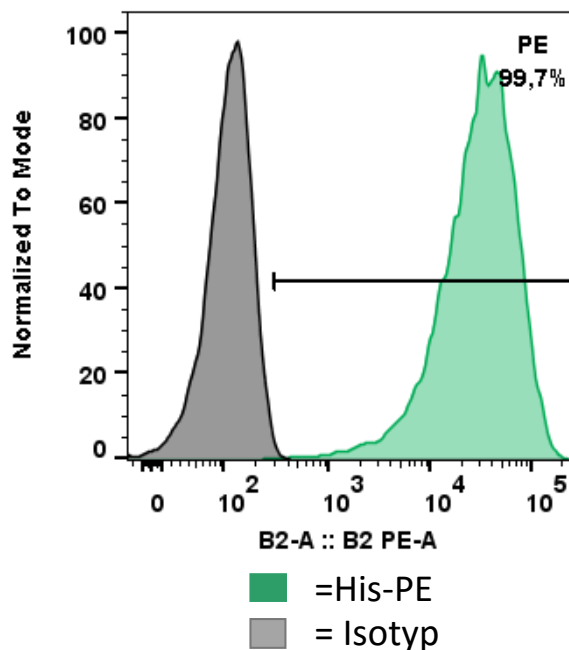


Abbildung 4.16: **Kontrolle der Biotinylierung der YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen.** Um dies zu zeigen wurden die Antikörper Biotin-PE bzw. IgG1-PE (siehe Tabelle 3.3) verwendet.

Die Abbildung 4.16 zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie von nur mit anti-

Biotin-Antikörpern gefärbten YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen. Die Biotinylierung dieser betrug 99,7 %.

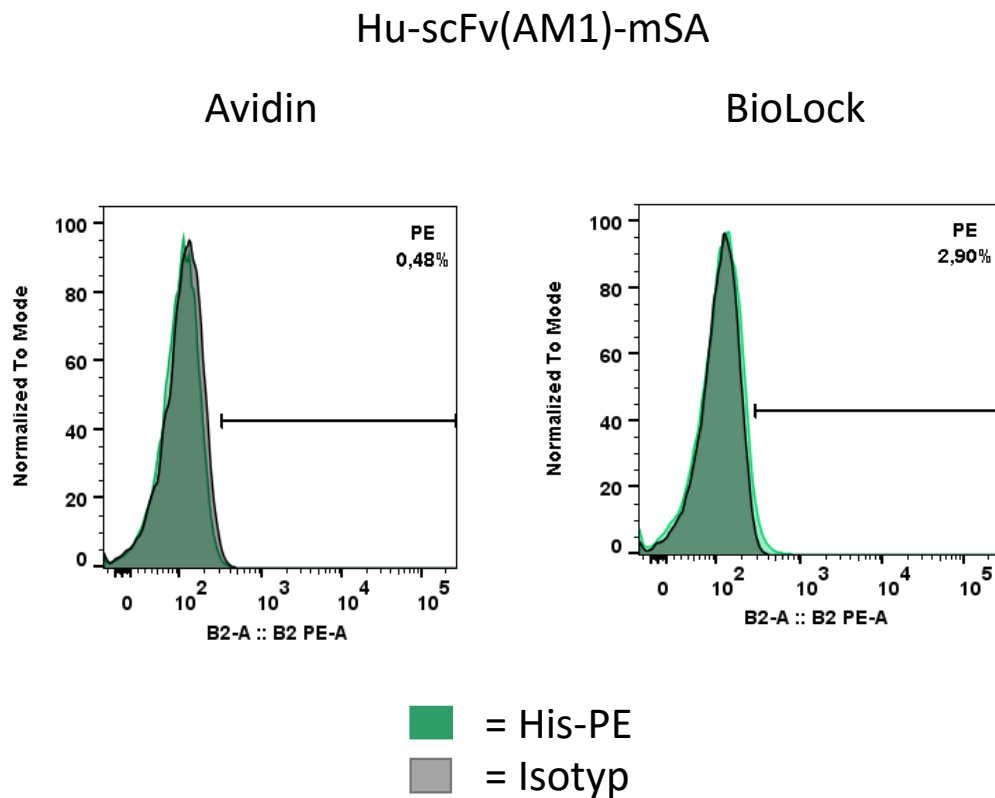


Abbildung 4.17: **Bindungsstudie des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA mit Avidin oder BioLock an die Effektorzellen.** Dabei wurden YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen mit biotinylierten Signaladapter verwendet, um die Bindung des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA über das monomere Streptavidin an die Effektorzellen zu untersuchen. Um dies zu zeigen wurden die Antikörper His-PE bzw. IgG1-PE (siehe Tabelle 3.3) verwendet. Die Produktion des Einzelkettenantikörpers erfolgte unter Avidin- bzw. BioLock-Zugabe bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 12,5 μ g/ml.

Der Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA hatte unter Verwendung von Avidin zu 0,48 % und unter Verwendung von BioLock zu 2,90 % an die YTS-NK-Zellen gebunden (siehe Abbildung 4.17).

Hu-scFv(AM1)-mSA

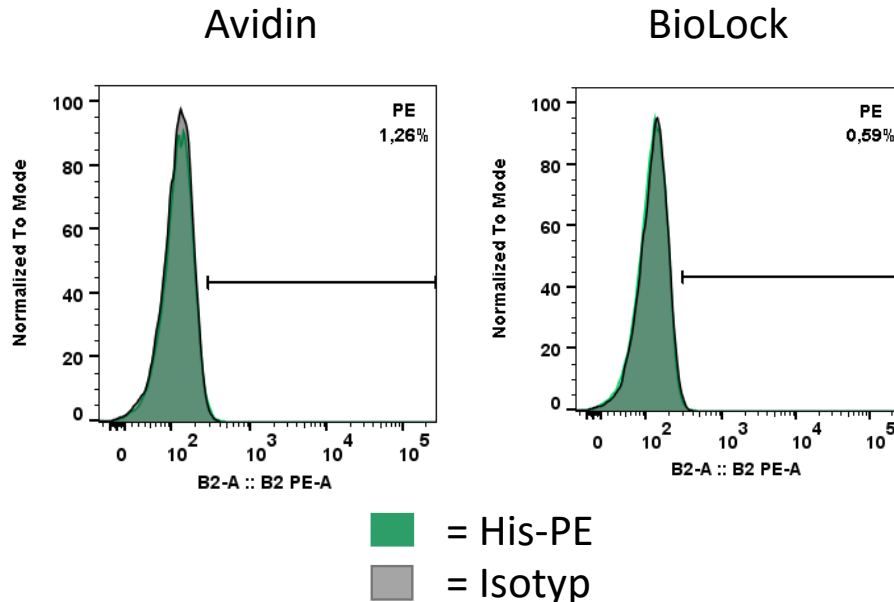


Abbildung 4.18: **Bindungsstudie des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA mit hoher Avidin- bzw. BioLock-Konzentration (50 µg/ml) an die Effektorzellen.** Dabei wurden YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen mit biotinylierten Signaladapter verwendet, um die Bindung des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA über das monomere Streptavidin an die Effektorzellen zu untersuchen. Um dies zu zeigen, wurden die Antikörper His-PE bzw. IgG1-PE (siehe Tabelle 3.3) verwendet.

Die Abbildung 4.18 zeigt die Ergebnisse der Bindung des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA, der mit einer angenommenen Biotinkonzentration (50 µg/ml) von Avidin bzw. BioLock im Medium produziert wurden, an die YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen. Dieser Einzelkettenantikörper band unter Verwendung von Avidin zu 1,26 % an die YTS-Zellen und unter Verwendung von BioLock zu 0,59 %.

Die Abbildungen 4.17 und 4.18 zeigen, dass kaum Einzelkettenantikörper an die YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen banden.

Da die Bindung des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA an die YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine andere Untersuchungsmethode angewendet. Dabei wurden $4 \cdot 10^5$ YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen mit 8 µg des Einzelkettenantikörpers für eine Stunde inkubiert. An-

schließlich erfolgte eine Inkubation mit Biotin-APC bzw. IgG1-APC. Die Abnahme der Biotinylierung spiegelt dabei proportional die Bindung des Einzelkettenantikörpers an die vollständig biotinylierten YTS-NK-Zellen wider. Je geringer die YTS-NK-Zellen biotinyliert sind, desto mehr Einzelkettenantikörper haben an diese gebunden.

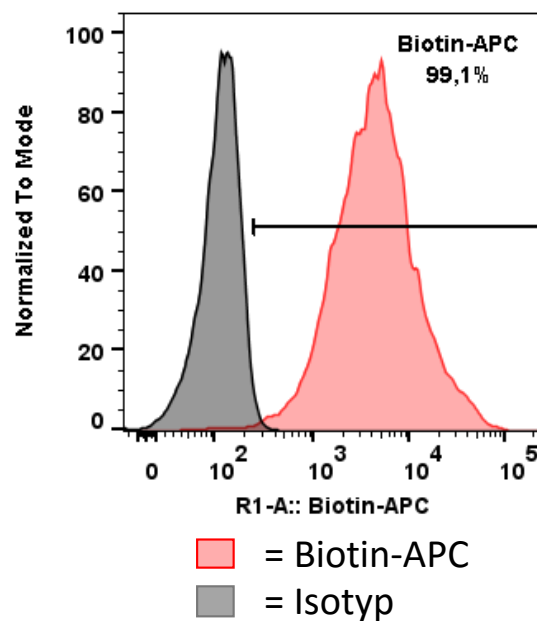


Abbildung 4.19: **Kontrolle der Biotinylierung der YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen.** Um dies zu zeigen, wurden die Antikörper Biotin-APC bzw. IgG1-APC (siehe Tabelle 3.3) verwendet.

Die Abbildung 4.19 zeigt die Biotinylierung der YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen ohne Inkubation mit dem Einzelkettenantikörper. Die YTS-Zellen waren zu 99,1 % biotinyliert sind.

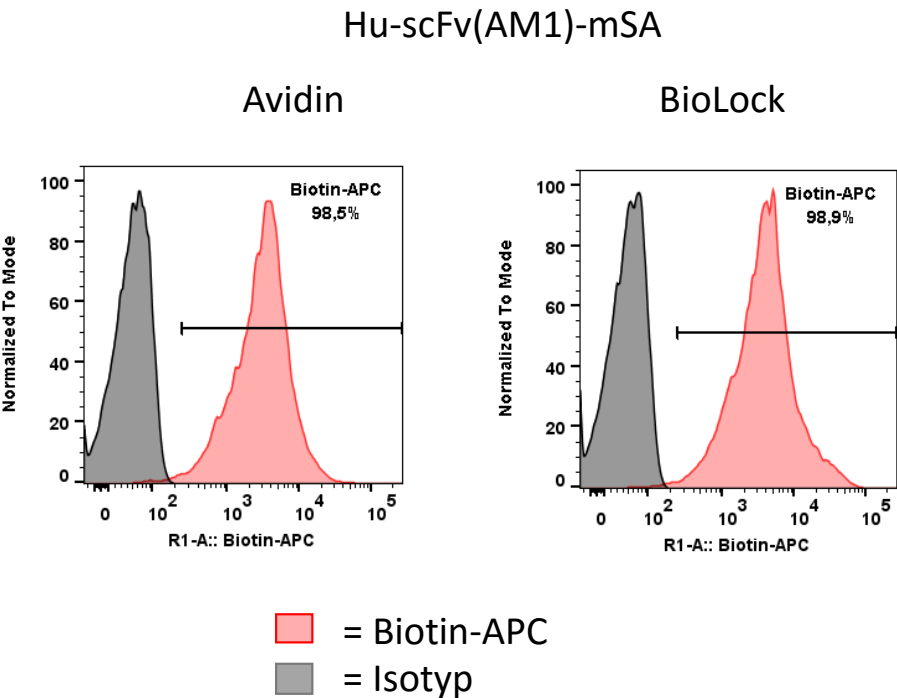


Abbildung 4.20: **Biotinylierung der YTS-NK-Zellen nach der Einzelkettenantikörperbindung.** Dabei wurden YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen mit biotinylierten Signaladapter verwendet, um die Bindung des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA über das monomere Streptavidin an die Effektorzellen zu untersuchen. Um dies zu zeigen, wurden die Antikörper Biotin-APC bzw. IgG1-APC (siehe Tabelle 3.3) verwendet.

In Abbildung 4.20 sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach der Inkubation des Einzelkettenantikörpers mit den YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen abgebildet. Die Biotinylierung der mit hu-scFv(AM1)-mSA inkubierten YTS-NK-Zellen betrug 98,5 % unter Verwendung von Avidin und 98,9 % unter Verwendung von BioLock. Dies deutet auf eine geringe Bindung des Einzelkettenantikörpers an die Effektorzellen hin. Um dies zu bestätigen, wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) dieses durchflusszytometrischen Verfahrens näher analysiert.

Tabelle 4.3: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der mit dem Einzelkettenantikörper inkubierten YTS-ΔDAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen, die im Anschluss mit Biotin-APC bzw. der Isotypkontrolle IgG1-APC gefärbt wurden.

	IgG1-APC	Biotin-APC	Differenz Biotin-APC - IgG1-APC
ohne Einzelkettenantikörper	110	4150	4040
hu-scFv(AM1)-mSA Avidin	47	2769	2722
hu-scFv(AM1)-mSA BioLock	45,7	3570	3524,3

Der MFI der Kontrolle, d.h. der biotinylierten YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen, welche nicht mit Einzelkettenantikörpern inkubiert wurden, lag bei 4040 (siehe Tabelle 4.3). Wenn die biotinylierten YTS-NK-Zellen mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA inkubiert wurden, sank der MFI (Avidin: 2722; BioLock: 3524,3), was für eine leichte Bindung des Antikörpers an die YTS-NK-Zellen spricht.

4.4.2 Western Blot Analyse

Um die Bindung des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA an die YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen nachzuweisen, wurde eine Milde Lyse (3.3.5) durchgeführt. Dies erfolgte, indem 10 μ g Einzelkettenantikörper mit $1 \cdot 10^5$ YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen für eine Stunde inkubiert wurden. Anschließend werden die Zellen mit einer Lösung, die aus RIPA-Puffer, Apoprotin und Leupeptin bestand, lysiert. Mit diesen Zelllysaten wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Abbildungen 4.21 bis 4.23 zeigen die Ergebnisse.

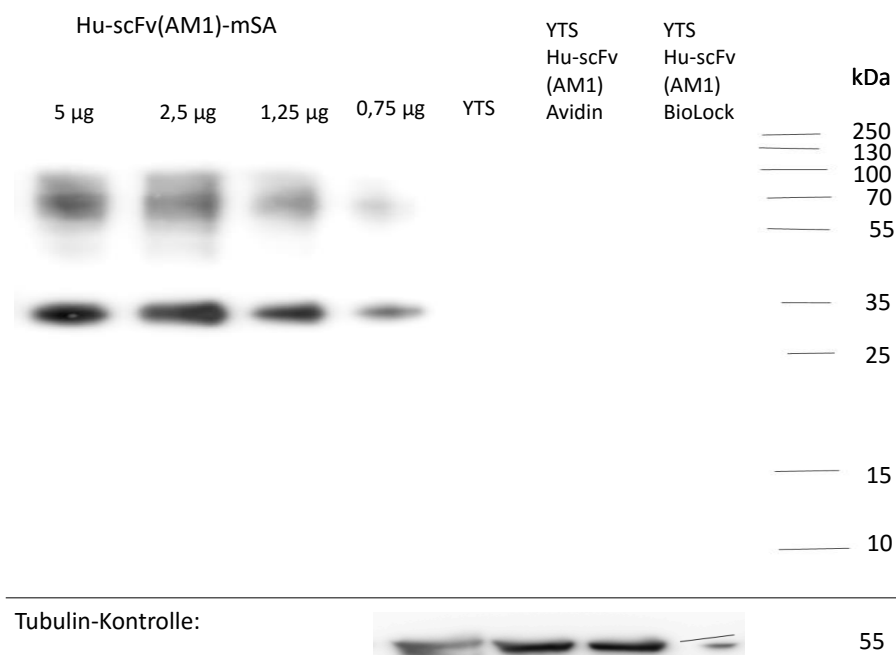


Abbildung 4.21: **Western Blot der mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA inkubierten YTS-NK-Zellen bei dem der VSV-G-Tag des Einzelkettenantikörpers detektiert wurde.** Die Untersuchung des Zelllysats, das aus YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen inkubiert mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA (52 kDa) bestand, erfolgte mittels Western Blot. Es wurden 10 μ g des Einzelkettenantikörpers mit $4 \cdot 10^5$ YTS-Zellen inkubiert. Zum Vergleich wurden unterschiedliche Mengen des aufgereinigten Einzelkettenantikörpers aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem VSV-G-Antikörper (1:8000), an dem ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper gebunden hat. Anschließend wurde eine Tubulin-Kontrolle durchgeführt mit anti- α -Tubulin.

Die Abbildung 4.21 zeigt den Western Blot bei dem der VSV-G-Antikörper verwendet wurde mit Tubulin-Kontrolle. Der Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA, der eine theoretische Größe von 52 kDa besitzen, zeigte bei ca. 35 kDa und zwischen 70 kDa und 100 kDa Banden. Bei den Zelllysaten waren sowohl mit Einzelkettenantikörper als auch ohne Einzelkettenantikörper keine Banden zu erkennen. Das theoretische Molekulargewicht der Einzelkettenantikörper, die an den biotinylierten Signaladapter Δ DAP12-KiBAP (20 kDa) gebunden haben beträgt 70 kDa. Die Tubulin-Kontrolle zeigte, dass gleichmäßig viel Protein bei den Zelllysaten aufgetragen wurde.

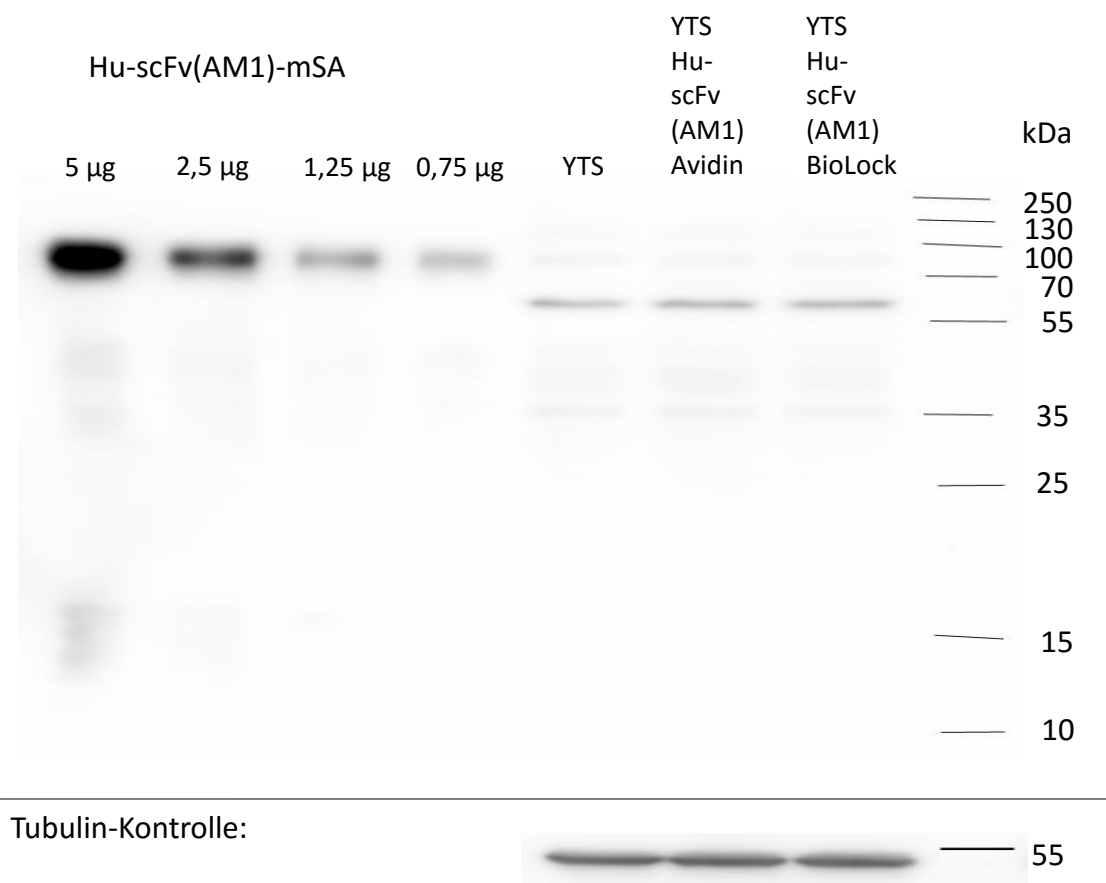


Abbildung 4.22: **Western Blot der mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA inkubierten YTS-NK-Zellen bei dem der His6-Tag des Einzelkettenantikörpers detektiert wurde.** Die Untersuchung des Zelllysats, das aus YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen inkubiert mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA (52 kDa) bestand, erfolgte mittels Western Blot. Es wurden 10 µg des Einzelkettenantikörpers mit $4 \cdot 10^5$ YTS-NK-Zellen inkubiert. Zum Vergleich wurden unterschiedliche Mengen des aufgereinigten Einzelkettenantikörpers aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem His-Antikörper (1:1000), an dem ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper gebunden hat. Anschließend wurde eine Tubulin-Kontrolle durchgeführt mit anti- α -Tubulin.

Die Ergebnisse des Western Blots unter Verwendung des His-Antikörpers sind in der Abbildung 4.22 zusehen. Zwischen 70 kDa und 100 kDa waren bei den aufgereinigten Einzelkettenantikörpern, die ein theoretisches Molekulargewicht von 52 kDa aufweisen, Banden zu erkennen. Bei den Zelllysaten mit und ohne Einzelkettenantikörper zeigte sich zwischen 55 kDa und 70 kDa eine unspezifische schwache Bande. Der Einzelkettenantikörper, der an den biotinylierten Signaladapter Δ DAP12-KiBAP (20 kDa) gebunden hat, würde hingegen ein Molekulargewicht von 70 kDa aufweisen.

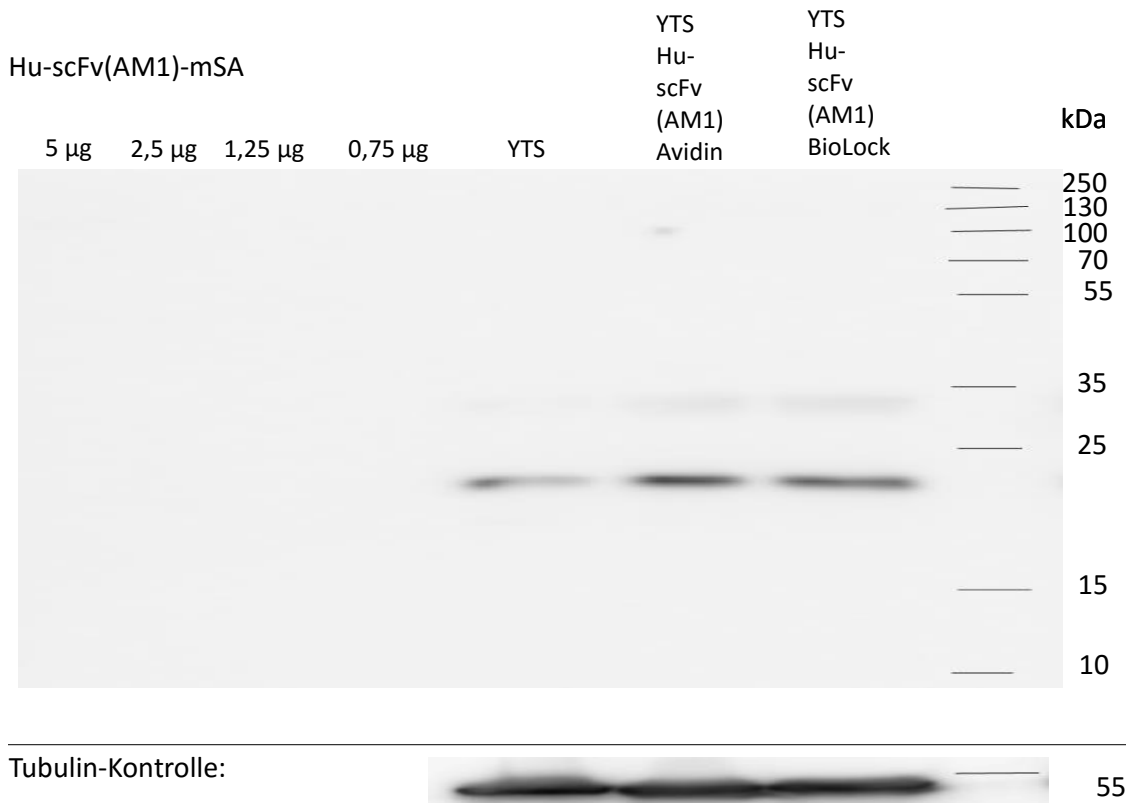


Abbildung 4.23: **Western Blot der mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA inkubierten YTS-NK-Zellen bei dem der myc-Tag des Signaladapters Δ DAP12-KiBAP (20 kDa) detektiert wurde.** Die Untersuchung Zelllysates, das aus YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen inkubiert mit dem Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA (52 kDa) bestand, erfolgte mittels Western Blot. Es wurden 10 µg des Einzelkettenantikörpers mit $4 \cdot 10^5$ YTS-NK-Zellen inkubiert. Zum Vergleich wurden unterschiedliche Mengen des aufgereinigten Einzelkettenantikörpers aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem myc-Antikörper (1:5000), an dem ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper gebunden hat. Anschließend wurde eine Tubulin-Kontrolle durchgeführt mit anti- α -Tubulin.

Der Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA erzeugte, wie in der Abbildung 4.23 zu sehen unter Einsatz des myc-Antikörpers keine Banden, da dieser keinen myc-Tag be-

sitzen. Bei den Zellysaten jedoch waren unterhalb von 25 kDa Banden zu erkennen, was dem Molekulargewicht des biotinylierten Signaladapters Δ DAP12-KiBAP ohne Einzelkettenantikörper von 20 kDa entspricht.

5 Diskussion

Um die Rückkehr von Krebs zu verhindern, wird an verschiedenen neuartigen Krebstherapieformen geforscht. Eine dieser Therapieformen ist der Einsatz von Einzelkettenantikörpern. Die in dieser Arbeit hergestellten Einzelkettenantikörper bestehen aus einem Einzelkettenantikörperfragment, das an die Antigene von Tumorzellen bindet und einem monomeren Streptavidin, das an biotinylierte Natürliche Killerzellen gekoppelt werden kann.

5.1 Generierung stabiler Zelllinien zur Produktion von hu-scFv(AM1)-mSA und scFv(MR1.1)-mSA

Für die Herstellung der Einzelkettenantikörper wurden mittels lentiviraler Expressionsvektoren virale Partikel hergestellt. Anschließend wurden diese durch eine stabile Transduktion in HEK293T-Zellen eingebracht. Danach erfolgte eine Selektion der Einzelkettenantikörper-produzierenden Zellen.

Die Einzelkettenantikörper-produzierenden Zelllinien HEK293T-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro bzw. HEK293T-scFv(MR1.1)-mSA-Puro wurden erfolgreich generiert und selektioniert.

5.2 Etablierung der Proteinproduktion

5.2.1 Proteinaufreinigung mit Nickel-NTA-Säulen

Laut Herstellerangaben kann die Nickel-NTA-Säule von Qiagen 300 µg pro Säule binden. Da jedoch nicht bekannt war, wie viel Einzelkettenantikörper in der Protein-Medium-Lösung enthalten sind, muss zunächst die Proteinaufreinigung etabliert werden. Dazu wurden verschiedene Volumina der Protein-Medium-Lösung auf Nickel-NTA-Säulen gegeben, um zu analysieren, bei welchen Volumen die Bindekapazität der Säule erreicht wurde. Anschließend wurden die bei den verschiedenen Wasch- und Elutionsschritten erhaltenen Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit VSV-G-Antikörpern oder His-Antikörpern. Dabei wurde die Aufreinigung von Einzelkettenantikörpern untersucht, bei deren Herstellung kein Avidin bzw. BioLock oder bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 12,5 µg/ml bzw. 50 µg/ml hinzugegeben wurde. Das Avidin und BioLock soll das freie Biotin im Medium binden und verhindern, dass die Einzelkettenantikörper schon während der Produktion an das freie Biotin im Medium

binden. Dies hätte zur Folge, dass das monomere Streptavidin der Einzelkettenantikörper nicht mehr an die biotinylierten NK-Zellen binden und somit diese nicht mehr bei der Erkennung und Beseitigung der Tumorzellen unterstützen können.

Die verschiedenen Avidin bzw. BioLock-Konzentrationen wurden verwendet, um herauszufinden, ob die Zugabe von Avidin bzw. BioLock während der Einzelkettenantikörperproduktion Einfluss auf diese hat. Die Konzentrationen für die Zugabe von Avidin bzw. BioLock wurden in meinem Vertiefungsmodul bestimmt. Die angenommene Biotinkonzentration von 12,5 µg/ml ist die geringste Konzentration, bei der die vollständige Entfernung des Biotins aus dem Zellkulturmedium sichergestellt ist. Die höchste angenommene Biotinkonzentration von Avidin bzw. BioLock bei der die Zellen noch nicht absterben, betrug 50 µg/ml. Die Konzentrationen von Avidin bzw. BioLock wurden nach Herstellerangaben von der angenommenen Biotinkonzentration ausgerechnet.

5.2.1.1 Western Blots des Einzelkettenantikörpers hu-scFv(AM1)-mSA

Es wurden $2 \cdot 10^5$ pHATrick-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro bzw. pHATrick-scFv(MR1.1)-mSA-Puro in eine T175-Zellkulturflasche ausgesät und nach 24 Stunden wurden Avidin bzw. BioLock bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 12,5 µg/ml dem Medium hinzugegeben. Anschließend wurde die Protein-Medium-Lösung abgenommen und verschiedene Volumina wurden über Nickel-NTA-Säulen aufgereinigt. Die Abbildungen 4.2 und 4.3 zeigen die Ergebnisse der Western Blot-Analyse. Dabei beträgt das optimale Beladungsvolumen der Nickel-NTA-Säule unter Verwendung von Avidin zur Einzelkettenantikörperproduktion 10 ml des Zellkulturüberstandes. Bei 15 ml Beladungsvolumen ist die Bindekapazität der Nickel-NTA-Säule erschöpft, da bereits im Waschschrift 2 Banden zwischen 70 kDa und 100 kDa nachgewiesen wurden, was auf ein frühzeitiges, unerwünschtes Abwaschen von Einzelkettenantikörpern hindeutet.

Das optimale Beladungsvolumen der Nickel-NTA-Säule unter Verwendung von BioLock zur Einzelkettenantikörperproduktion beträgt hingegen 15 ml des Zellkulturüberstandes, da erst bei 30 ml Beladungsvolumen Banden zwischen 70 kDa und 100 kDa im Waschschrift 2 detektiert wurden.

Dies deutet darauf hin, dass die unteren Banden bei ca. 35 kDa der unvollständige Einzelkettenantikörper ist. Dieser unvollständige Einzelkettenantikörper enthält den VSV-G-Tag und kann deshalb durch den anti-VSV-G-Antikörper detektiert werden, während der His6-Tag und wahrscheinlich auch Teile des monomeren Streptavidins fehlen, wodurch diese Banden nicht in dem His-Western Blot beobachtet werden konnten. Das kann unter anderem auf ein unerwünschtes, alternatives Splicen der mRNA zurückgeführt werden. Die oberen Banden könnten der vollständige Einzelkettenantikörper sein, der aufgrund starker Glykosylierungen an einen anderen Einzelkettenantikörper bindet und deshalb bei einer doppelt so hohen Größe (ca. 100 kDa) ein Bande aufweist.

Die Tabellen 4.1 und 4.2 zeigen die Proteinkonzentrationen der Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritte (E1, E2) bei der Aufreinigung verschiedener Volumina über Nickel-NTA-Säulen. Das optimale Beladungsvolumen zur Aufreinigung über die Nickel-NTA-Säule liegt bei dem Einzelkettenantikörper mit Avidin bei 10 ml Zellkulturüberstand. Bei dem Einzelkettenantikörper mit BioLock lag das optimale Beladungsvolumen bei 15 ml Zellkulturüberstand. Dies konnte anhand der Proteinkonzentrationen nur teilweise bestätigt werden (Tabelle 4.2). Bei 15 ml aufzureinigenden Zellkulturmedium wurden in den beiden Elutionsschritten zusammen insgesamt 332 µg/ml Einzelkettenantikörper gewonnen, was unter der Konzentration in den Elutionsschritten bei 10 ml (449 µg/ml) Beladungsvolumen lag. Da dieser Versuch nicht wiederholt wurde, könnte es sich um einen „Ausreißer“ handeln.

Die annähernd gleichen Konzentrationen von durchschnittlich ca. 450 µg/ml in den Elutionsschritten bei 10 ml und 30 ml deuten, wie bereits in Tabelle 4.2 diskutiert, auf eine Erschöpfung der Bindekapazität der Nickel-NTA-Säule hin. Somit wäre auch bei der Aufreinigung der Einzelkettenantikörper, die unter BioLock-Zugabe produziert wurden, ein Beladungsvolumen von 10 ml optimal, auch wenn noch kein Einzelkettenantikörper im Waschschrift 2 bei 15 ml Beladungsvolumen (Abbildung 4.2) nachweisbar war.

5.2.1.2 Western Blots des Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA

Die Produktion und Aufreinigung des Einzelkettenantikörpers scFv(MR1.1)-mSA wurde über ein Western Blot analysiert. Es erfolgte eine Detektion gegen den VSV-G-Tag (Abbildung 4.3). Dabei ist jedoch zu sehen, dass die Bindungskapazität der Nickel-NTA-Säule mit 30 ml Zellkulturüberstand überschritten wurde, da bei dem Waschschrift 1 und 2 zwischen 70 kDa und 100 kDa eine Bande zu erkennen ist und somit ungebundener Einzelkettenantikörper von der Säule gewaschen wurde. Auch bei der Western Blot-Analyse des scFv(MR1.1)-mSA sind keine Banden bei der zu erwartenden Größe des Einzelkettenantikörpers von ca. 52 kDa nachweisbar, sondern neben der Bande zwischen 70-100 kDa nur noch eine Bande bei 35 kDa. Wie im oberen Abschnitt (5.2.1.1) bereits erläutert, könnte es sich bei der Bande zwischen 70 kDa und 100 kDa um den stark glykosylierten Einzelkettenantikörper handeln und bei der Bande bei 35 kDa um ein verkürztes Einzelkettenantikörperfragment aufgrund von alternativen Splicing.

5.2.2 Coomassie Gele und PonceauS-Färbung

Um zu kontrollieren, ob die Aufreinigung der Antikörper über Nickel-NTA-Säule erfolgreich war oder ob noch viele Verunreinigungen aus dem Zellkulturmedium im Eluat vorhanden waren, erfolgte die Färbung des SDS-Gels mit SimplyBlue SafeStain. Die PVDF-Membran wurde hingegen mit der PonceauS-Lösung gefärbt (siehe Tabelle 3.5).

Die Abbildung der beiden Coomassie-Gele der Einzelkettenantikörper (Abbildungen 4.5 und 4.6) zeigen, dass sehr viele Verunreinigungen in Form von unspezifischen Proteinen aus dem Zellkulturmedium herausgespült wurden. Jedoch waren im Eluat (E1 und E2) nicht nur Banden auf Höhe von 70-100 kDa und 35 kDa, wie im Western Blot (Abbildung 4.4), zusehen, sondern auch noch viele unspezifische Proteinbanden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Einzelkettenantikörper nicht zu 100 % rein für die Versuche vorlag. Genauso ist es bei der mit PonceauS gefärbten PVDF-Membran. Jedoch waren dort im Eluat (E1, E2) wesentlich weniger bis keine unspezifischen Proteinbanden zu sehen.

5.2.3 Untersuchung der Antikörper bei Verwendung von großen Mengen an BioLock oder Avidin (50 µg/ml)

Da bei den bisherigen Western Blot-Analysen keine Bande bei der erwarteten Größe des Einzelkettenantikörpers von ca. 52 kDa zuerkennen war, wurde der hu-scFv(AM1)-mSA mit einer Avidin- bzw. BioLock-Konzentration bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 50 µg/ml hergestellt. Anschließend wurde eine Western Blot-Analyse dieses Einzelkettenantikörpers, bei der gegen VSV-G-Tag detektiert wurde, durchgeführt (Abbildung 4.9).

Auch bei der Verwendung von hohen Avidin- und BioLock-Konzentrationen sind sowohl die Banden bei 35 kDa bei allen Proben zu erkennen als auch die Banden zwischen 70 kDa und 100 kDa. Dabei handelt es sich, wie bereits unter 5.2.1 diskutiert, bei der Bande bei 35 kDa um ein verkürztes Einzelkettenantikörperfragment aufgrund von alternativen Splicing und bei der Bande zwischen 70 kDa und 100 kDa um den stark glykosylierten Einzelkettenantikörper. Jedoch ist bei der zu erwartenden Größe des Einzelkettenantikörpers von 52 kDa keine Bande detektiert wurden.

Aufgrund der Überladung der Nickel-NTA-Säule ist die Bande zwischen 70 kDa und 100 kDa bei allen Wasch- und Elutionsschritten, mit Ausnahme des Waschschrilles 1, bei dem Einzelkettenantikörper, der unter Zugabe von BioLock hergestellt wurde, nachweisbar und stark ausgedehnt.

5.2.4 Untersuchung der Antikörper ohne Verwendung von BioLock oder Avidin

Es wurden Einzelkettenantikörper ohne die Zugabe von Avidin bzw. BioLock hergestellt, um zu untersuchen, ob eine Avidin- bzw. BioLock-Zugabe Einfluss auf die Antikörperproduktion und somit auf die detektierenden Proteine im Western Blot hat.

Die Abbildung 4.10 zeigt die Einzelkettenantikörper, welche ohne Zugabe von Avidin

und BioLock hergestellt wurden. Dabei sind die Banden bei ca. 35 kDa nur noch sehr schwach zu erkennen. Jedoch sind die Banden zwischen 70 kDa und 100 kDa bei allen Wasch- und Elutionsschritten zu sehen. Es scheint also mehr Antikörper produziert zu werden, da in den Waschschritten schon viel Einzelkettenantikörper rausgewaschen wurde im Vergleich zur Avidin- bzw. BioLock-Zugabe. Somit beeinflusst Avidin und BioLock den Stoffwechsel der Produktionszellen etwas negativ. Jedoch bleibt das 35 kDa-Produkt erhalten, so dass es unabhängig von der Anwesenheit Avidins und BioLocks im Zellkulturmedium entsteht.

5.3 Untersuchung der Bindung an die Zieltumorzellen

Um die Bindung der Einzelkettenantikörper an die Zieltumorzellen zu untersuchen, wurden diese mit 8 µg der Einzelkettenantikörper für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der FACS-Antikörper dazugegeben (siehe Tabelle 3.2).

Der in dieser Arbeit hergestellte scFv(MR1.1)-mSA band zu maximal 3,46 % an die HEK293T-EGFRvIII-Zellen (Abbildung 4.12) während der etablierte scFv(MR1.1)-KiBAP-Antikörper als Positivkontrolle für die EGFRvIII-Expression der HEK293T-EGFRvIII-Zellen zu mehr als 99 % auf der Zelloberfläche detektiert wurde (Abbildung 4.15). Die Sequenzierung des scFv(MR1.1)-mSA zeigte, dass dessen Sequenz keine Fehler aufweist. Ein Grund, warum der scFv(MR1.1)-mSA nicht bindet, können Glykosylierungen sein, die auch eine Ursache für das abweichende Molekulargewicht im Western Blot (Abb. 4.3) sein könnten.

Der Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA hingegen band zu fast 100 % an die HEK293T-PSCA-Zellen, wenn Avidin und BioLock-Konzentrationen bei einer maximal angenommenen Biotinkonzentration von 12,5 µg/ml bei der Einzelkettenantikörperproduktion zugegeben wurden (siehe Abbildungen 4.11 und 4.12). Bei höheren Konzentrationen von Avidin und BioLock (50 µg/ml) band der Einzelkettenantikörper nur zu 74,3 % bzw. 9,7 % (siehe Abbildungen 4.13 und 4.14). Somit hemmt eine erhöhte Zugabe von Avidin bzw. BioLock während der Herstellung der Einzelkettenantikörper die Bindung dieser an die Tumorzellen.

Mittels des Durchflusszytometrischen-Antikörpers Biotin-PE kann überprüft werden, ob die an die Tumorzellen gebundenen Einzelkettenantikörper biotinyliert sind. Sowohl der hu-scFv(AM1)-mSA als auch der scFv(MR1.1)-mSA besaßen kein an das monomere Streptavidin gebundenes Biotin (Abbildungen 4.11 bis 4.14). Jedoch könnte es auch sein, dass der FACS-Antikörper Biotin-PE aufgrund von sterischen Hinderungen nicht an das Biotin binden konnte und somit kein Signal detektiert wurde.

5.4 Untersuchung der Bindung an die YTS-Effektorzellen

5.4.1 Durchflusszytometrische Analyse

Aufgrund der gewünschten fehlenden Biotinylierung der Einzelkettenantikörper bei der Untersuchung der Bindung von Einzelkettenantikörpern mit den Tumorzellen (4.3), wurden Experimente mit YTS-NK-Zellen durchgeführt (4.4.1). Bei dieser Untersuchung wurde nur der hu-scFv(AM1)-mSA verwendet, da dieser im Vergleich zu den scFv(MR1.1)-mSA an die Tumorzellen gebunden hatte. Die Zelllinie YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo hat einen biotinylierbaren Signaladapter Δ DAP12-KiBAP, an dem der Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA über das monomere Streptavidin binden könnte. Dafür müssen aber als Voraussetzungen gegeben sein, dass der Einzelkettenantikörper nicht biotinyliert ist und dass der Signaladapter biotinyliert sind. Dafür wurde zuerst die Biotinylierung der YTS-NK-Zellen mit Biotin-PE untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass 99,7 % der YTS-NK-Zellen biotinyliert waren (Abbildung 4.16). Jedoch band der Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA zu maximal 2,90 % an die YTS-NK-Zellen (Abbildung 4.17) und 4.18. Dies kann zum einen daran liegen, dass der His-Tag des Einzelkettenantikörpers verdeckt wird und so der His-PE-Antikörper nicht binden kann. Des Weiteren könnte der Einzelkettenantikörper doch biotinyliert sein oder aufgrund seiner Faltung nicht an das Biotin der YTS-NK-Zellen binden.

Um herauszufinden, ob diese geringe Bindung unter anderem daran liegt, dass der FACS-Antikörper His-PE nicht an dem His-Tag binden kann, wurde die Bindung des Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA indirekt über die Biotinylierung der YTS- Δ DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo ohne und mit Zugabe des Einzelkettenantikörpers untersucht. Denn wenn der Einzelkettenantikörper an die YTS-NK-Zellen bindet, müsste die Biotinylierungsrate der YTS-NK-Zellen zurückgehen, da mehr Biotin verdeckt wird und der Biotin-PE-Antikörper nicht mit diesem gebundenen Biotin interagieren kann.

Die Biotinylierung der biotinylierten YTS-NK-Zellen nimmt mit Zugabe von hu-scFv(AM1)-mSA nicht ab und liegt weiterhin bei ungefähr 98,5 % bzw. 98,9 % (Abbildung 4.20), was gegen eine Bindung des Einzelkettenantikörpers über sein monomeres Streptavidin an die biotinylierten Signaladapter Δ DAP12-KiBAP der YTS-NK-Zellen spricht. Jedoch könnte die zugegebene Antikörpermenge auch nicht ausgereicht haben, um die biotinylierten Signaladapter abzudecken.

Um dies zu untersuchen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dieser durchflusszytometrischen Analyse ausgewertet. Dazu wurde die Differenz zwischen dem MFI der Isotyp-Kontrolle und dem MFI der mit Biotin-APC-gefärbten YTS-NK-Zellen errechnet. Dabei nahm der MFI bei Zugabe von hu-scFv(AM1)-mSA im Vergleich zum MFI ohne Einzelkettenantikörperzugabe ab. Dies deutet darauf hin, dass der hu-scFv(AM1)-

mSA schwach an die YTS-NK-Zellen band.

5.4.2 Western Blot Analyse

Um sicher zu gehen, dass der Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA nicht an die YTS- Δ -DAP12-KiBAP-Puro-BirA-Zeo-Zellen bindet, wurden diese mit dem Einzelkettenantikörper inkubiert und anschließend lysiert. Diese Zelllysate wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels myc-, His- bzw. VSV-G-Antikörpern auf der PVDF-Membran analysiert (Abbildungen 4.21 bis 4.23).

Dabei ist zu sehen, dass der VSV-G-Tag nicht in den Zelllysaten nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.21). Beim Western Blot mit dem His-Antikörper gibt es nur unspezifische Bindungen, da diese auch bei den YTS-NK-Zellen, die ohne Einzelkettenantikörper inkubiert wurden, zu sehen sind. Mit dem myc-Antikörper konnte nur die biotinylierten Signaladapter detektiert werden. Zur Kontrolle, ob gleichmäßig viel Protein aufgetragen wurden, erfolgte eine Tubulin-Kontrolle. Diese ergab, dass sich in allen Proben ungefähr die gleiche Proteinmenge befand. Das Nicht-Entstehen der Banden unter Verwendung des VSV-G- und des His-Antikörpers deutet darauf hin, dass der Einzelkettenantikörper nicht an die YTS-NK-Zellen gebunden hat.

6 Ausblick

Auch heutzutage wird noch nach weiteren Möglichkeiten, zur vollständigen Beseitigung von Krebs geforscht. Eine Möglichkeit, um die Tumorzellbeseitigung zu unterstützen, ist der Einsatz von Einzelkettenantikörpern. Die in dieser Arbeit hergestellten Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA bzw. scFv(MR1.1)-mSA binden zum einen an die Antigene PSCA bzw. EGFRvIII der Tumorzellen und zum anderen mit dem fusionierten monomeren Streptavidin an biotinylierte Natürliche Killerzellen. Dadurch sollen die Natürlichen Killerzellen die Tumorzellen erkennen und beseitigen.

Da die Bande bei ca. 35 kDa in den Western Blots mit dem VSV-G-Antikörper, wie unter anderem in der Abbildung 4.2, weisen auf die Produktion von unvollständigen Einzelkettenantikörpern hin, da diese nicht im Western Blot mit His-Antikörper zu detektieren sind. Im nächsten Schritt sollten zuerst die Splice-Acceptor- und Splice-Donor-Sites untersucht werden. Im Anschluss könnten durch Mutagenese diese Splice-Acceptor- und Splice Donor-Sites eliminiert werden und dadurch sollten nur noch vollständige Einzelkettenantikörper produziert werden.

Die schlechte Bindung des scFv(MR1.1)-mSA (maximal 5,31 %) an das EGFRvIII der Tumorzellen kann eventuell zurückgeführt werden auf Glykosylierungen. Dafür werden gegensätzliche Peptide in dem hinteren Sequenzabschnitt im scFv(MR1.1)-mSA eingebaut, um die Glykosylierungen zu verhindern. Die Nutzung von Glykosylierungsinhibitoren könnte somit zu einer verbesserten Bindung an die Tumorzellen führen.

7 Zusammenfassung

Eine neue Art der Unterstützung von Natürlichen Killerzellen bei der Erkennung und Vernichtung der Tumorzellen ist der Einsatz von Einzelkettenantikörpern. Der Einzelkettenantikörper bindet dabei zum einen an die speziellen Antigene von Tumorzellen und zum anderen über ein fusioniertes, monomeres Streptavidin an biotinylierte Natürliche Killerzellen.

Das Ziel in dieser Arbeit war es, die Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA und scFv(MR1.1-mSA) herzustellen und zu charakterisieren. Dabei wurde zu den Einzelkettenantikörper-herstellenden Zelllinien HEK293T-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro bzw. HEK293T-scFv(MR1.1)-mSA-Puro Avidin bzw. BioLock hinzugegeben, deren Aufgabe darin bestand das freie Biotin im Medium zu binden. Dadurch soll verhindert werden, dass das monomere Streptavidin schon während seiner Herstellung von freiem Biotin besetzt wird und somit nicht mehr in der Lage ist, an die biotinylierten Natürlichen Killerzellen zu binden.

Die Einzelkettenantikörper-produzierenden Zelllinien HEK293T-hu-scFv(AM1)-mSA-Puro bzw. HEK293T-scFv(MR1.1)-mSA-Puro konnten erfolgreich hergestellt werden. Es wurde bei dem hergestellten Einzelkettenantikörper hu-scFv(AM1)-mSA eine Bindung von 92,6 % unter Verwendung von Avidin bzw. 98,0 % unter Verwendung von BioLock bei der Einzelkettenantikörperproduktion an die HEK293T-PSCA-Zellen beobachtet. Der hu-scFv(AM1)-mSA bindet also vollständig an die Tumorzellen. Jedoch band dieser Einzelkettenantikörper nur sehr schlecht (Avidin: 0,48 %; BioLock: 2,9 %) an die biotinylierten YTS-NK-Zellen auch unter Zugabe von hohen Avidin bzw. BioLock-Konzentrationen. Die Biotinylierung des hu-scFv(AM1)-mSA betrug jedoch nur 0,86 % unter Verwendung von Avidin bzw. 1,26 % unter Verwendung von BioLock bei einer angenommenen Biotinkonzentration von 12,5 µg/ml. Der scFv(MR1.1)-mSA band sowohl kaum an die HEK293T-EGFRvIII-Zellen als auch an die biotinylierten YTS-NK-Zellen.

Literaturverzeichnis

- Antranikian, G. (2006). *Angewandte Mikrobiologie*. Springer Verlag Berlin, 1 edition.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S.-M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., and Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877):423–6.
- Boussif, O., Lezoualch, F., Zanta, M. A., Schermann, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:7297–7301.
- Davies, G. C., Ryan, P. E., Rahman, L., Zajac-Kaye, M., and Lipkowitz, S. (2006). Egfrviii undergoes activation-dependent downregulation mediated by the cbl proteins. *Oncogene*, 25(49):6497–6509.
- Demonte, D., Drake, E. J., Lim, K. H., Gulick, A. M., and Park, S. A. (2013). Structure-based engineering of streptavidin monomer with a reduced biotin dissociation rate. *Proteins*, 81(9):1621–1633.
- Demonte, D., Dundas, C. M., and Park, S. (2014). Expression and purification of soluble monomer streptavidin in escherichia coli. *Biotechnological Products and Process Engineering*, 98:6285–6295.
- Feldmann, A., Stamova, S., Bippes, C. C., Bartsch, H., Wehner, R., Schmitz, M., Temme, A., Cartellieri, M., and Bachmann, M. (2011). Retargeting of t cells to prostate stem cell antigen expressing tumor cells: comparison of different antibody formats. *Prostate*, 71(9):998–1011.
- Fenstermaker, R. A. and Ciesielski, M. J. (2004). Immunotherapeutic strategies for malignant glioma. *Cancer Control*, 11(3):181 – 191.
- Gan, H. K., Cyrlicic, A. N., and Johns, T. G. (2013). The epidermal growth factor receptor variant iii (egfrviii): where wild things are altered. *the FEBS Journal*, 280(21):5350–70.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Naim, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by dna from human adenovirus type 5. *Journal of general virology*, 36:59–72.
- Gu, Z., Thomas, G., Yamashiro, J., Shintaku, I. P., Dorey, F., Raitano, A., Witte, O. N.,

- Said, J. W., Loda, M., and Reiter, R. E. (2000). Prostate stem cell antigen (psca) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene*, 19(10):1288–1296.
- Heimberger, A. B., Hlakty, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., and Aldape, K. (2005). Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and egfrviii in glioblastoma multiforme patients. *Clinical Cancer Research*, 11:1462–1466.
- Huang, H.-J., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X.-D., Huang, C.-M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavennee, W. K. (1997). The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human ccancer is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:2927–2935.
- Janeway, C. A. J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health und Disease*. ChurchillLivingstone.
- Kuan, C. T., Wikstrand, C. J., Archer, G., Beers, R., Pastan, I., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. (2000). Increased binding affinity enhaunces targeting of glioma xenografts by egfrviii-specific scfv. *International Journal of Cancer*, 66(6):962–969.
- Kuan, C. T., Wikstrand, C. J., and Bigner, D. D. (2001). Egf mutant receptor viii as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer*, 8(2):83–96.
- Laitinen, O. H., Hytönen, V. P., Nordlund, H. R., and Kulomaa, M. S. (2006). Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63:2992–3017.
- Lim, K. H., Huang, H., Pralle, A., and Park, S. (2013). Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(1):57–67.
- Malpiedi, L. P., Díaz, C. A., Nerli, B. B., and Jr., A. P. (2013). Single-chain antibody fragments: Purification methodologies. *Process Biochemistry*, 48:1242–1251.
- Martinez, M. P. (2001). *Untersuchung zellulärer und humoraler Immunparameter bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich in Abhängigkeit von TumorsTumor und Therapieform*. PhD thesis, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Müller, J. M., Risse, J. M., Jussen, D., and Flaschel, E. (2013). Development of fed-batch strategies for the production of streptavidin by streptomyces avidinii based

- on power input and oxygen supply studies. *Journal of Biotechnology*, 163:325–332.
- Müller, N. (2014). *Generierung und Evaluation von modifizierten NK-Zellen mit SDF-1Alpha-chemotaxis und Reaktivität gegen EGFRvIII-positive Gliomzellen*. PhD thesis, Technische Universität Dresden.
- Nagane, H., Coufal, F., Lin, H., Bögler, O., Cavenee, W. K., and Su Hung, H.-J. (1996). A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Research*, 56:5079–5086.
- Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Su Hung, H.-J., Furnari, F. B., and Cavenee, W. K. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway in glioblastomas. *Cancer Research*, 62:6764–6769.
- Reiter, R. E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Beau, M. M. L., Loda, M., and Witte, O. N. (1998). Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Medical Sciences*, 95:1735–1740.
- Sampson, J. H., Archer, G. E., Mitchell, D. A., Heimberger, A. B., and Bigner, D. D. (2008). Tumor-specific immunotherapy targeting the egfrviii mutation in patients with malignant glioma. *Seminars in Immunology*, 20:267–275.
- Shankar, S., Vaidyanathan, G., Kuan, C.-T., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. (2006). Anti-epidermal growth factor variant iii scfv fragment: effect of radioiodination method on tumor targeting and normal tissue clearance. *Nucl Med Biol*, 33(1):101–110.
- Smith, P. K., Krohen, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1):76–85.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acid*, 23(4):628–633.
- Tietze, S. (2015). *Entwicklung einer Dendrimer-basierten KrebsstheKrebs zur selektiven Eliminierung von Glioblastomzellen mittels tumorspezifitumor siRNA*. PhD thesis, Technische Universität Dresden.
- Verma, R., Boleti, E., and George, A. J. T. (1998). Antibody engineering: Comparison of

- bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of Immunological Methods*, 216(1-2):165–181.
- Watabe, T., Lin, M., Ide, H., Donjacour, A. A., Cunha, G. R., Witte, O. N., and Reiter, R. E. (2002). Growth, regeneration, and tumorigenesis of the prostate activates the psca promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1):401–406.
- Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., R. C. J., Traweek, S. T., Wong, A. J., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. (1995). Monoclonal antibodies against egfrviii are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Research*, 55:3140–3148.
- Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. (1998). The class iii variant of the epidermal growth factor receptor (egfrviii): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *Journal of NeuroVirology*, 4:148–158.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11):1393–1398.
- Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M., and Schlom, J. (1992). Rapid tumor penetration of a single-chain fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Research*, 52(12):3402–8.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Mittweida, im August 2016